

Einführung von Disulfid- und Sulfid-Vernetzungen in
synthetische Polypeptide und in Serum-Albumin durch
OH→SH Umwandlungen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

eingereicht beim

Fachbereich Physikalische Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

Hartmut Knipp
aus Hamm/Westf.

Marburg/Lahn 1976

**Einführung von Disulfid- und Sulfid-Vernetzungen in
synthetische Polypeptide und in Serum-Albumin durch
OH $\rightarrow$ SH Umwandlungen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

eingereicht beim

**Fachbereich Physikalische Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

vorgelegt von

**Hartmut Knipp
aus Hamm/Westf.**

Marburg/Lahn 1976



Vom Fachbereich Physikalische Chemie der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am

22.4.1976

Tag der mündlichen Prüfung

30.4.1976

Berichterstatter:

Prof.Dr. G.Ebert

Mitberichterstatter:

Prof.Dr. H.Follmann

Herrn Prof. Dr. G. Ebert möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für die mir während ihrer Durchführung gewährte Unterstützung danken.

Herrn Prof. Dr. H. Follmann danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Witzel, Direktor des Instituts für Biochemie der Universität Münster, möchte ich an dieser Stelle für Anregungen und Diskussionen danken.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat diese Arbeit in dankenswerter Weise großzügig unterstützt.

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1972 bis 1975 im Fach Polymere des Fachbereiches Physikalische Chemie der Philipps-Universität Marburg/Lahn durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Darstellung von Poly-L-serin und Copoly-N ^ε -carbobenzoxy-L-lysyl-L-serin (3/7) und (1/1)	5
2.1. Charakterisierung der dargestellten Serin-Polymeren/ Copolymeren	8
3. Einführung von Disulfid- und Sulfid-Vernetzungen in die dargestellten Serin-Polymeren/Copolymeren	12
3.1. Lanthionin-Bildung bei der alkalischen Umesterung durch β-Eliminierungsreaktionen	22
4. Darstellung und Vernetzung des Copoly-N ^ε -carbobenzoxy-L-lysyl-L-threonin	25
4.1. Diskussion der bei der OH → SH Umwandlung des Threonins möglichen Reaktionswege und der hierbei anfallenden seltenen Aminosäuren	29
5. Löslichkeiten der vernetzten und unernetzten Polypeptide	32
6. Enzymatischer Abbau am vernetzten Copoly-Ser/Lys (7/3) und (1/1)	35
7. Einführung von zusätzlichen Disulfid-Brücken in Serum-Albumin- interchenare Brückenbildung	38
8. Zusammenfassung der Ergebnisse	45
9. Experimenteller Teil	47
9.1. Darstellung der N-Carboxy-anhydride	47
9.2. Darstellung des Poly-L-serins	50
9.3. Darstellung des Copoly-N ^ε -cbo-L-lysyl-L-serin (3/7) und (1/1)	50
9.4. Darstellung des Copoly-N ^ε -cbo-L-lysyl-L-threonin (1/1)	52
9.5. OH → SH -Umwandlung am Poly-L-serin	52
9.6. OH → SH -Umwandlung am Copoly-Cbolys/Ser	53

	Seite
9.7. OH → SH -Umwandlung am Copoly-Cbols/Thr	54
9.8. OH → SH -Umwandlung am Rinderserum-Albumin	54
9.9. Durchführung des enzymatischen Abbaues	55
9.10. Bestimmung der freien SH-Gruppen nach ELLMAN	55
9.11. Durchführung der Aminosäure-Analysen	56
9.12. Durchführung der gelchromatographischen Trennungen	57
9.13. Durchführung der Molekulargewichtsbestimmungen	58
9.13.1. Endgruppen-Verfahren nach SANGER	58
9.13.2. Molekulargewichtsbestimmung mittels Dampfdruck-Osmometer	60
9.13.3. Molekulargewichtsbestimmung mittels analytischer Ultrazentrifuge	62
9.14. Röntgen-Analysen	66
9.15. IR-, CD- und DTA-Analysen	68
10. Literaturverzeichnis	69

Verzeichnis der Abkürzungen

Acser	= O-Acetyl-L-serin
Acthr	= O-Acetyl-L-threonin
Ala	= Alanin
Arg	= Arginin
Asp	= Asparaginsäure
BSA	= Rinderserum-Albumin
Cbo-	= Carbobenzoxy-
Cbolys	= N ^ε -Carbobenzoxy-L-lysin
Cys	= Cystein, in Aminosäurechromatogrammen: Cystin
DCE	= Dichloressigsäure
Dhala	= Dehydroalanin (α -Amino-acrylsäure)
β, β' -Dimcys	= β, β' -Dimethylcystein
DMF	= N-Dimethyl-formamid
DNFB	= 2,4-Dinitro-fluorbenzol
DNP-	= 2,4-Dinitro-phenyl-
DTN	= 5,5'-Dithio-bis-(2-nitro-benzoesäure)
Glu	= Glutaminsäure
Gly	= Glycin
Hcys	= Homocystein, in Aminosäurechromatogrammen: Homocystin
HFIPA	= 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol
His	= Histidin
Hser	= Homoserin
Ile	= Isoleucin
Lan	= Lanthionin
Leu	= Leucin
Lys	= Lysin
MBSA	= modifiziertes Rinderserum-Albumin
Mcys	= β -Methyl-cystein
Met	= Methionin
Phe	= Phenylalanin

Pro	= Prolin
Ser	= Serin
TFE	= Trifluoressigsäure
THF	= Tetrahydrofuran
Thr	= Threonin
Tos-Ser	= O-Tosyl-L-serin
Tos-Thr	= O-Tosyl-L-threonin
Tyr	= Tyrosin
Tris	= Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Val	= Valin

1. Einleitung

Die Raumstruktur von natürlichen und synthetischen Proteinen wird neben den Wasserstoff-Brücken der Peptidbindungen durch Vernetzungen der Polypeptid-Seitenketten geprägt. In natürlichen Proteinen finden sich folgende Bindungsbrücken der Seitenketten am häufigsten: a) Die ionogenen Salzbrücken, die zwischen den freien -COO^- - und -NH_3^+ -Gruppen gebildet werden, b) die H-Brücken zwischen polaren Seitenketten, c) die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen apolaren Seitengruppen und d) die kovalenten Disulfid-Brücken des Cysteins, die auch in dieser Arbeit behandelt werden.

Daneben sind in natürlichen Proteinen in geringem Maße auch ω -Peptidbindungen zwischen seitständigen Carboxyl- und Amino-Gruppen bekannt.

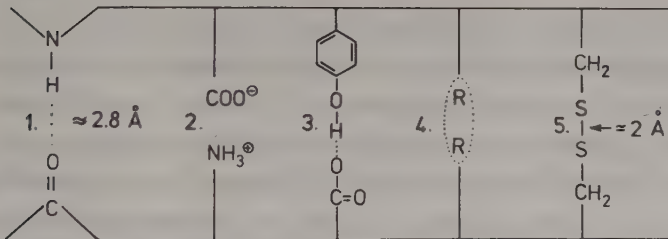
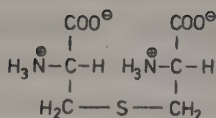
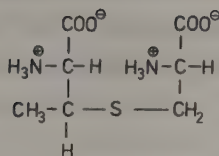


Abb. 1: Die vier wichtigsten Brückenbindungsarten in natürlichen Proteinen: H-Brücke der Peptidbindung (1.), Salz-Brücke (2.), H-Brücke der Seitenkette (3.), hydrophobe Wechselwirkungen apolarer Gruppen (4.), Disulfid-Brücke (5.).

Die kovalenten Sulfid-Brücken in natürlichen (unbehandelten) Proteinen sind erst seit einigen Jahren bekannt. Sie werden durch die seltenen Aminosäuren L-Lanthionin (S-[2-Carboxy-2-amino-äthyl]-L-cystein) und β -Methyl-L-lanthionin (S-[1-Methyl-2-carboxy-2-amino-äthyl]-L-cystein) in die Proteine eingeführt.



L-Lanthionin



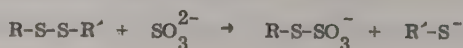
β -Methyl-L-Lanthionin

Das Lanthionin wurde erstmals aus Hydrolysaten alkalisch behandelter Wolle isoliert (1). Lanthionin und β -Methyl-lanthionin kommen als Brückenbildner in der meso-Form der natürlichen Polypeptide Subtilin (Antibiotikum aus *Bazillus subtilis*, 32 Aminosäurereste) und Nisin (Antibiotikum aus *Streptococcus lactis*, 34 Aminosäurereste) (2) vor.

Die Bildung von Sulfid-Brücken ist ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit.

Die Zahl und Lage der Disulfid-Brücken ist von großer Bedeutung für die Konformationsstabilität fibrillärer und globulärer Proteine. Sie können - wie die anderen Brückenarten - innerhalb einer Polypeptidkette (intrachenar) Aminosäurereste überbrücken wie auch zwei Ketten verbinden (interchenar). Zwei bekannte Beispiele interchenarer Disulfid-Brückenbindungen in globulären Proteinen sind die Verknüpfungen der A- und B-Ketten des Insulins durch zwei Disulfid-Brücken und der vier Ketten der Untereinheiten des Immunglobulins (γ -Globulin) der Antikörper durch drei bis fünf Disulfid-Brücken (3,4).

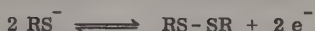
Die Spaltungen der Disulfid-Brücken erfolgen entweder oxidativ oder reduktiv. Die oxidative Spaltung mittels Perameisen- oder Peressig-Säure ergibt Cysteinsäure ($\text{R-SO}_3\text{H}$). Die oxidative Sulfitolyse mittels SO_3^{2-} führt zum Thiosulfonat ($\text{R-SSO}_3\text{H}$) und Sulfid, das entweder mit Schwermetallionen ausgefällt werden kann oder - zum Disulfid reoxydiert - erneut gespalten wird.



Die reduktive Spaltung von Disulfid-Brücken zu SH-Gruppen wird z.B. mit Mercaptanen vorgenommen, wobei zur Vermeidung von Sekundärreaktionen wie Reoxidation die entstandenen SH-Gruppen blockiert werden müssen.

Neben den oben erwähnten sind noch weitere Spaltungsmöglichkeiten bekannt. In vivo verläuft die Disulfidspaltung über Oxidoreduktasen.

Die Bindungsenergie der -S-S-Brücke beträgt $E(S-S) = 50 \text{ kcal/Mol}$, (5), also etwa das zehnfache der Bindungsenergie der H-Brücken. Die Redox-Reaktion



in wäßriger Lösung hat ein elektrochemisches Standardpotential E' von -0,2 V bis -0,4 V, z.B. Cystin/Cystein (- 0,22 V); Albumin, Ribonuclease (- 0,24 V); Insulin (- 0,38 V) (6). Hieraus ergeben sich nach der Beziehung $\Delta_R G' = nFE'$ eine freie molare Standardenthalpie von $\Delta_R G' = -9,2$ bis $-18,4 \text{ kcal/Mol}$ für die oxidative Disulfidverknüpfung in wäßriger Lösung, die wegen der negativen ΔG -Werte relativ leicht ablaufen kann.

Von Ch. EBERT (7) wurden in cystinfreie fibrilläre Proteine Disulfid-Brücken durch $\text{OH} \rightarrow \text{SH}$ -Umwandlung eingeführt. Die Reaktionen wurden an Kollagen-Folien und Seidenfibroin durchgeführt. Dabei ergab sich ein Serin $\rightarrow$ Cystein Umsatz bis etwa 50 %. Die unvernetzten und die disulfidvernetzten Fasern und Folien zeigten Unterschiede in ihren physikalischen Eigenschaften, z.B. im Kontraktionsverhalten in Elektrolytlösungen.

In Anlehnung hieran werden in der vorliegenden Arbeit Disulfid-Vernetzungen in cystin-freie Modell-Polypeptide eingeführt. Es sind dies das Poly-L-serin und Copolymere aus L-Serin und N^ϵ -Cbo-L-lysin. Auch die Bildung von Lanthionin und damit die Ausbildung von Sulfid-Brücken werden an diesen Polypeptiden untersucht. Es wird weiterhin die $\text{OH} \rightarrow \text{SH}$ -Umwandlung an einem Copolymeren aus L-Threonin und N^ϵ -Cbo-L-lysin versucht, wobei die dem Homocystein isomere α -Amino- β -mercaptobuttersäure entstehen muß. Untersuchungen über Konformationsänderungen werden an den oben aufgeführten Verbindungen vorgenommen. Die durch die Vernetzungen verursachten bedeutsamen Veränderungen der Löslichkeitseigenschaften werden gezeigt. In diesem Zusammenhang ist auch die Bestimmung der Vernetzungsgrade von Bedeutung. Ferner wird das enzymatische Abbauverhalten zweier vernetzter Serin/Lysin-Copolymerer verglichen; dieses Verhalten könnte aus umwelt-biologischer Sicht

interessant sein. Die Einführung von Disulfid- und Sulfid-Brücken in fibrilläre Polypeptide wird ergänzt durch $\text{OH} \rightarrow \text{SH}$ -Umwandlungen an einem globulären natürlichen Protein, dem wasserlöslichen Serum-Albumin. Dieses besitzt in seiner natürlichen Form schon 17 Cystin-Brücken (8). Die Einführung weitere Brücken könnte auch eine interchenare Vernetzung bedeuten, wodurch sich ein n-faches Molekulargewicht des natürlichen Albumins ergeben würde.

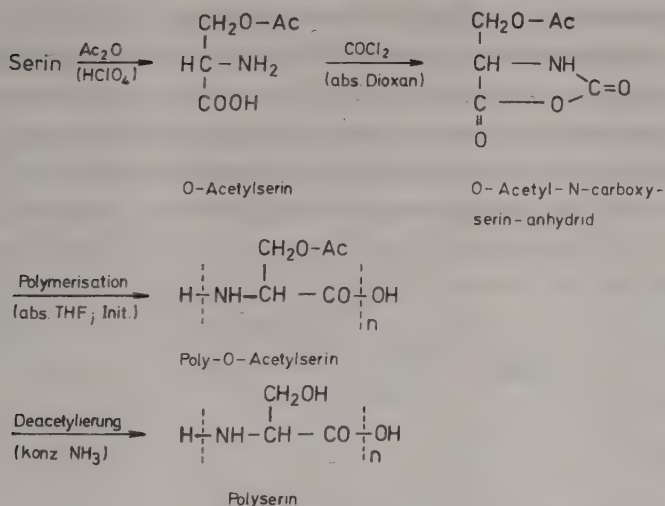
Die Umwandlung von monomerem Serin in Cystein führte I. PHOTAKI durch (9). Diese Versuche wurden durch $\text{OH} \rightarrow \text{SH}$ -Umwandlungen an dem dimeren L-Serylglycin und dem trimeren Glycyl-L-serylglycin von I. PHOTAKI und V. BARDAKOS erweitert (10). SAKAMOTO (11) und SCHWENKER (12) führten Cellulose durch $\text{OH} \rightarrow \text{SH}$ -Umwandlung in Mercapto-Cellulose über. POLGAR et al. (13) wandelten das aktive Serin der Protease Subtilisin in Cystein um, was eine deutliche Aktivitätsminderung des Subtilisins zur Folge hatte. In allen diesen Arbeiten bestand der erste Reaktionsschritt der Umwandlung in einer Tosylierung der Hydroxyl-Gruppen. So paßt in diese Aufzählung auch die von KOSHLAND et al. (14) vorgenommene Umwandlung von Chymotrypsin in Anhydro-chymotrypsin, wobei das tosylierte aktive Serin nicht wie beim Subtilisin umgeestert, sondern durch Eliminierung in Dehydroalanin überführt wurde, was ebenfalls einen deutlichen Aktivitätsabfall verursachte. Diese Eliminierungsreaktion wird auch in der vorliegenden Arbeit behandelt.

Die Aufgabe dieser Arbeit ist es zu zeigen, ob und inwieweit es möglich ist a) in synthetische Polypeptide und b) in ein natürliches wasserlösliches Protein Schwefel-Vernetzungen durch $\text{OH} \rightarrow \text{SH}$ -Umwandlungen des Serins und Threonins einzuführen. Die dabei erhaltenen Umsätze werden mit denen einiger anderer Systeme obiger Literatur verglichen. Die Frage nach den durch die Vernetzungen bewirkten möglichen Veränderungen in den Strukturen und den damit verbundenen Eigenschaftsänderungen der Polymeren wird durch physikalisch-chemische Messungen zu beantworten versucht.

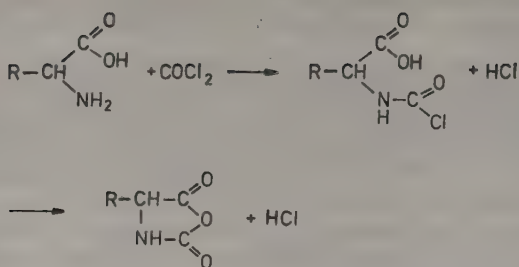
2. Darstellung von Poly-L-serin und Copoly-N^c-carbobenzoxy-L-lysyl-L-serin (3/7) und (1/1)

Für die Einführung von Schwefel-Vernetzungen in Poly- α -aminosäuren durch OH $\rightarrow$ SH-Umwandlungen wurde zunächst das Poly-L-serin als einfache Modellsubstanz gewählt. Die dabei durchgeführten Reaktionen und erhaltenen Umsätze sollten auf ähnliche strukturierte natürliche Proteine übertragbar sein.

Die Synthese des Poly-D,L-serins nach FRANKEL et al. (15) und die des Poly-L-serins nach FASMAN u. BLOUT (16) über das Leuchs'sche Anhydrid (N-Carboxyanhydrid) des O-Acetylserins verläuft nach folgendem Reaktionsschema:

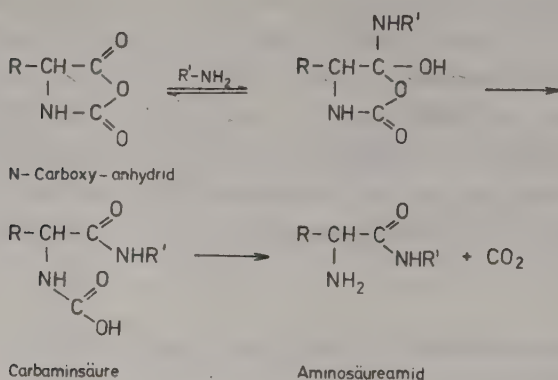


Das N-Carboxyanhydrid wurde nach der Fuchs'schen Synthese (17) durch Umsetzung mit Phosgen erhalten:



N-Carboxy-anhydrid (Oxazolidin-2,5-dion)

Als Lösungsmittel wurde absolutes Dioxan (bzw. abs. THF) verwendet. Die Polymerisation wurde anionisch in abs. THF durchgeführt (Initiator: 0,2 n NaOH; Polymerisationszeit: 14 Tage bei Zimmertemperatur). BAILAY et al. (18) zeigten, daß bei der basisch induzierten Polymerisation der Aminosäure-NCA's in Lösung durch primäre und sekundäre Amine oder durch protische Basen eine Addition der Base am C-5 des (Oxazolidin-dion)-Ringes die Spaltung zur Carbaminsäure verursacht. Diese decarboxyliert sehr schnell (am C-2) zur Aminosäure; ist die Base ein Amin, dann führt die Reaktion zum Aminosäure-Amid:

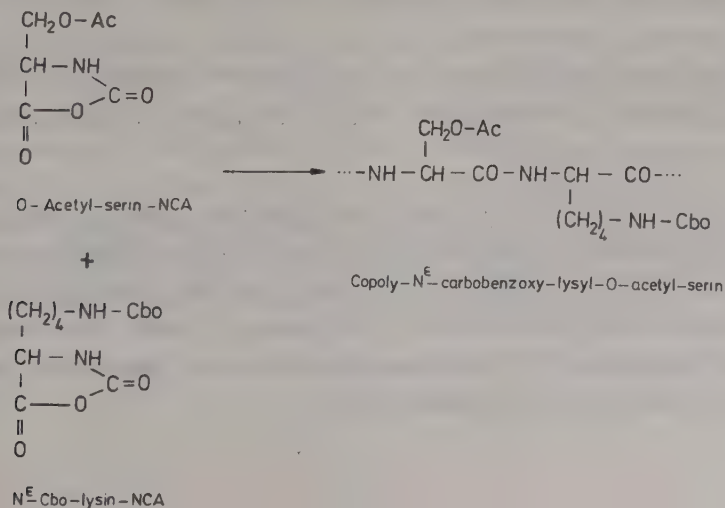


Die somit gebildete Aminosäure bzw. das Amid reagiert nun als Initiator in der gezeigten Weise weiter zum Dipeptid, dieses zum Tripeptid usw.

Da während der Reaktion die Zahl der Basengruppen und damit die Initiatorkonzentration $[I]$ gleich bleibt, ergibt sich bei einer Anfangskonzentration des Monomeren $[M]_0$ ein theoretisches Zahlenmittel des Polymerisationsgrades von $\bar{P}_n = \frac{[M]_0}{[I]}$. Dies gilt natürlich nur dann, wenn keine zu Abbrüchen oder Nebenreaktionen führenden Verunreinigungen (z.B. nicht absolut wasserfreies Lösungsmittel) vorhanden sind. Die hier eingesetzten Konzentrationen hatten Zahlenverhältnisse von etwa 100 bis 180. Eine Verringerung des Polymerisationsgrades gegenüber dem theoretisch bestimmten Wert war aber in erster Linie dadurch zu erwarten, daß bei bestimmten Graden das Polymere in den genannten Lösungsmitteln unlöslich wurde und dadurch die Reaktion heterogen verläuft.

Um weniger kompakte Strukturen - wie die des Poly-L-serins - zu erhalten, wurden Copolymere aus L-Serin und N^ϵ -Carbobenzoxy-L-lysin dargestellt, die möglicherweise einer $OH \rightarrow SH$ -Reaktion leichter zugänglich sind. Die großen N^ϵ -geschützten Seitengruppen des L-Lysins sollten hier die dicht gepackte β -Struktur (siehe Kap.3.) des Poly-L-serins "auflockern". Die statistischen Copolymere wurden in einem Serin/Lysin-Verhältnis von etwa 7/3 und 1/1 synthetisiert.

Für die Polymerisation wurden die Leuchs'schen Anhydride des O-Acetyl-L-serins und des N^ϵ -Carbobenzoxy-L-lysins, welches ebenfalls nach der Fuchs'schen Synthese dargestellt wurde, eingesetzt:



Polymerisiert wurde wiederum anionisch in THF durch Initiierung mit Pentylamin ($[M]_0/[I] \approx 180$) 10 Tage bei Zimmertemperatur. Die Deacetylierung wurde vollständig mit 25 %-igem NH_3 sowohl bei Poly-O-Acetylserin wie beim Copoly- N^ϵ -cbo-lysin-O-acetylserin erreicht. Dieses und die unter diesen Bedingungen nicht entfernte Carbobenzoxy-Gruppe der Copolymeren geben IR-Spektren wieder (Abb. 2).

2.1. Charakterisierung der dargestellten Serin-Polymeren / Copolymeren

Das Molekulargewicht des Poly-O-acetyl-L-serins wurde durch Endgruppenbestimmung nach SANGER erhalten (19). Hierbei werden das Monomere und das Polymere mit 2,4-Dinitrofluorbenzol umgesetzt (nucleophile Substitution durch die Aminogruppe) und die entstandenen Farbstoffe ($\lambda_{max} \approx 340 \text{ nm}$, $CHCl_3$) photometrisch in ihren Lösungsextinktionen verglichen. Dabei ergab sich ein Zahlenmittel des Molekulargewichtes von $\bar{M}_n \approx 7000$, was einem mittleren Polymerisationsgrad $\bar{P}_n = 54$ entspricht.

Das Molekulargewicht des Copoly- N^ϵ -carbobenzoxy-L-lysyl-O-acetyl-L-serins (3/7) wurde dampfdruckosmometrisch (20) ermittelt. Als Lösungsmittel diente hier das Hexafluoropropanol. Es ergab sich ein Zahlenmittel von $\bar{M}_n = 6200$ und ein Polymerisationsgrad von $\bar{P}_n = 36$. Es zeigt sich also ein deutlich höherer Polymerisationsgrad des Polymeren gegenüber dem des Copolymeren, obgleich unter sehr ähnlichen Bedingungen polymerisiert wurde. Die erhaltenen Polymerisationsgrade betragen etwa 1/4 bis 1/3 der theoretisch berechneten.

Die Lösungseigenschaften der dargestellten Polymere / Copolymere werden im Zusammenhang mit ihren vernetzten Produkten in 2.5. behandelt. Grundsätzlich kann gesagt werden, daß das Lösungsverhalten der O-Acserin/ N^ϵ -Lys-cbo-Copolymeren dem des Poly-acetylserins in etwa entspricht, während z.B. das Poly-L-serin abweichendes Verhalten zeigt (Tab. 3).

Die Lage der IR-Banden des Poly-L-serins wie die des Poly-O-acetyl-L-serins (in KBr) weisen auf eine β -Struktur im festen Zustand hin (21). CD-Spektren des wasserlöslichen Anteils des Polyserins in Wasser und des Poly-O-acetyl-serins in HFIPA ergaben keinen Hinweis auf helicale Konformation in Lösung. Die IR-Spektren des Copoly-CboLys/Acser (3/7) und Copoly-CboLys/Ser (3/7) zeigen keine Lageveränderungen der Amid A, I, II-Banden (Abb. 2).

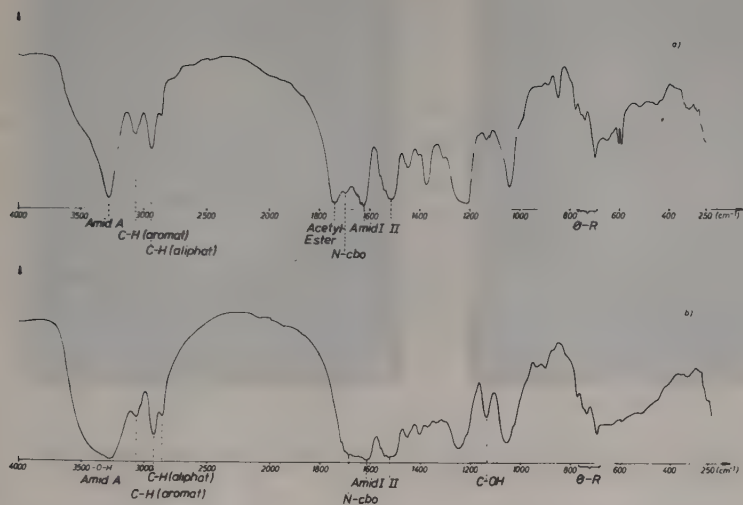


Abb.2: IR-Spektren des a) Copoly- N^{ϵ} -cbo-L-lysyl-O-acetyl-L-serin (3/7),
b) Copoly-Cbolys/Ser (3/7).

Die Schulter (bei 1650 cm^{-1}) der Amid I-Bande wird hier allerdings durch die breite N-Cbo-Bande überlagert, die ihr Maximum bei etwa 1700 cm^{-1} hat.

So haben auch diese Copolymeren eine β -Konformation in festem Zustand. Dasselbe gilt für die Lys/Ser-Copolymeren (1/1), die natürlich stärkere N-Cbo-Banden zeigten.

Die Röntgen-Pulverdiagramme (Abb.3) und Goniometer-Pulverspektren (Abb.9) des Poly-L-serins und des Copoly- N^{ϵ} -cbo-L-lysyl-L-serin (3/7) zeigen allerdings in Intensität und Schärfe der Reflexe deutliche Unterschiede.

Die scharfen Linienreflexe des Poly-L-serins verbreitern sich beim Copolymeren unter Verstärkung einiger Intensitäten. Ein Vergleich der Reflexlagen der beiden Polymeren ergibt sich besser aus den Goniometer-Spektren (Abb.9). Die Auswertung der Linienreflexe des Poly-L-serins ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

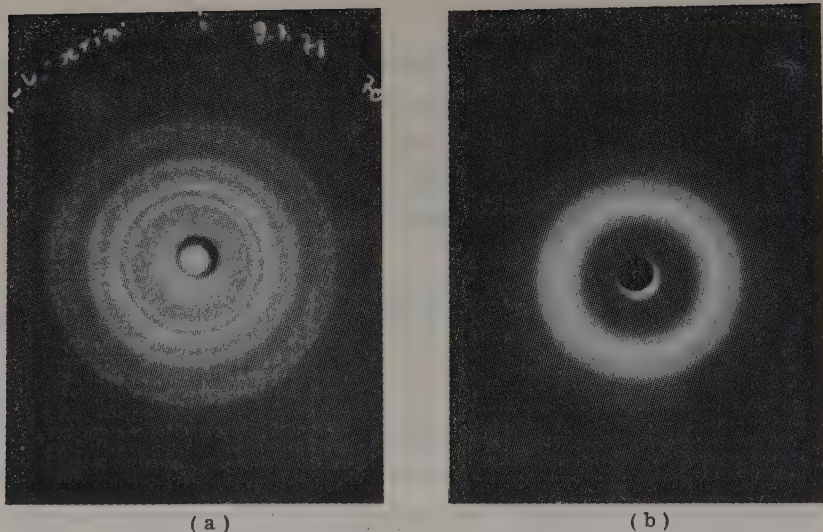


Abb. 3: Röntgen-Pulverdiagramme des Poly-L-serins (a) und des Copoly-N^e-cbo-lysyl-L-serins (3/7) (b).

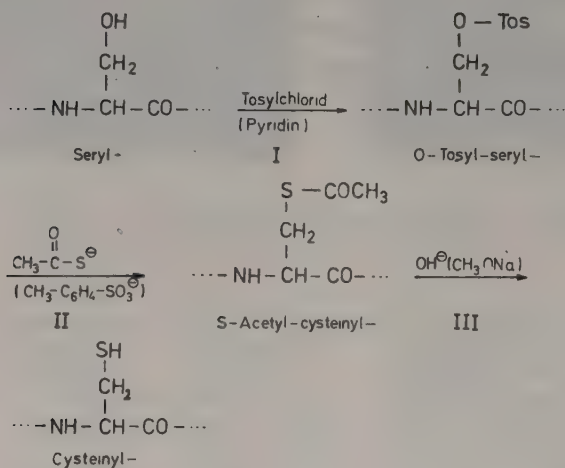
Linien Nr.	Photo d (Å)	Goniometer d (Å)	Literatur d (Å)	rel. Intensitäten
1	6,4	6,8	6,5 - 7,0	sehr schwach
2	5,5	5,4	5,7	schwach
3	4,5	4,5	4,5 ± 0,2	sehr stark
4	4,1	4,2	4,25	weniger stark
5	3,6	3,8	—	weniger stark
6	3,4	3,6	3,7 ± 0,1	stark
7	2,9	2,9	2,9 ± 0,1	weniger stark
8	2,6	2,7	—	weniger stark

Tab. 1: d-Werte und relative Intensitäten aus Röntgen-Pulverdiagrammen und Goniometer-Spektren des Poly-L-serins. Die Liniennummern ergeben sich aus den Röntgen-Photos von innen nach außen, d.h. von kleinen nach großen Glanzwinkeln θ .

Im Vergleich mit Literaturwerten (4, 21, 22) ergeben sich zwei zusätzliche Linien (Nr. 5 und 8), die allerdings bei weniger scharfen Aufnahmen wie Abb. 3b mit den Linien Nr. 6 und 7 als zwei breite Reflexe zusammenfallen. Die Linie Nr. 1 deutet bei kleinerem d-Wert auf eine parallele β -Faltblattstruktur, bei größerem Wert auf eine antiparallele β -Konformation hin (4). Eine solche Abschätzung kann hier natürlich - auch wegen der sehr schwachen Reflexe - nicht gemacht werden. Die sehr starke Linie Nr. 3 erscheint beim Copolymeren (Abb. 3b) mit etwa doppelter Intensität, aber praktisch mit gleichem Abstand ($d = 4,6 \text{ \AA}$ aus Spektrum Abb. 9). So weist auch der Röntgenanalysenvergleich von Poly-L-serin mit dem Copoly-Cbolys/Ser (3/7) darauf hin, daß dieses in einer - wenn auch gestörten - β -Struktur vorliegt.

3. Einführung von Disulfid- und Sulfid-Vernetzungen in die dargestellten Serin-Polymeren / Copolymeren

Die in Kap. 2. dargestellten Polymeren und Copolymeren des Serins wurden nun Reaktionen unterworfen, die I. PHOTAKI (9,10) und Ch. EBERT (7) zur Überführung von OH-Gruppen des Serins in Cystein-SH-Gruppen anwandten. Sie laufen nach folgendem Schema ab:



Der Reaktionsschritt I führte beim Poly-L-serin wie auch bei den Serin-Copolymeren zu relativ hohen Umsätzen von 43 - 66 % tosyliertem Serin (Tab.2). Schwierigkeiten bereitete dagegen Schritt II insbesondere beim tosylierten Poly-L-serin. Die besten Serin / Cystein-Umsätze wurden mit einer 4 n Kaliumthioacetat-Lösung bei Zimmertemperatur erreicht. Es wurde jeweils bei pH 9 und pH 11 umgeestert. Hierbei ergaben sich OH $\rightarrow$ SH-Umsätze zwischen 14 und 35 Mol-% (Tab.2). Für die relativ geringen Umsätze sind wohl die Unlöslichkeit der tosylierten Polymeren und die dicht gepackte β -Struktur, die besonders beim Poly-L-serin ausgeprägt ist, verantwortlich. Die OH $\rightarrow$ SH-Umsätze wurden aminosäureanalytisch bestimmt. Die Reaktionsführung bei pH 9 und pH 11 (3 - 5 Tage) schloß den Reaktionsschritt III ein, so daß die alkalische Esterspaltung nicht bei höherem pH-Wert vorgenommen werden mußte (23), was auch für Lanthionin-Bildung von Bedeutung ist. Es zeigte

sich nämlich, daß mit steigendem pH-Wert bei der Umesterung der Lanthionin-Anteil größer wurde (Tab.2). Hierauf wird noch ausführlicher in Abschnitt 3.2. eingegangen.

Die Oxidation des Cysteins zum Cystin geht schon mit Luftsauerstoff in Lösung sehr rasch. Hierzu ist aber die räumliche Nähe zweier Cystein-Reste Voraussetzung. So ist die Bestimmung der nicht zum Disulfid oxidierbaren SH-Gruppen für die Berechnung des Disulfid-Vernetzungsgrades notwendig. Der Anteil der freien Cystein-SH-Gruppen wurde nach der Methode von ELLMAN (24) bestimmt. Hierbei reduzierten die Hydrolysate der SH-haltigen Polymeren die 5, 5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTN) zum gelben Farbstoff 3-Carboxy-4-nitro-thiophenol, der photometrisch bestimmt wird.

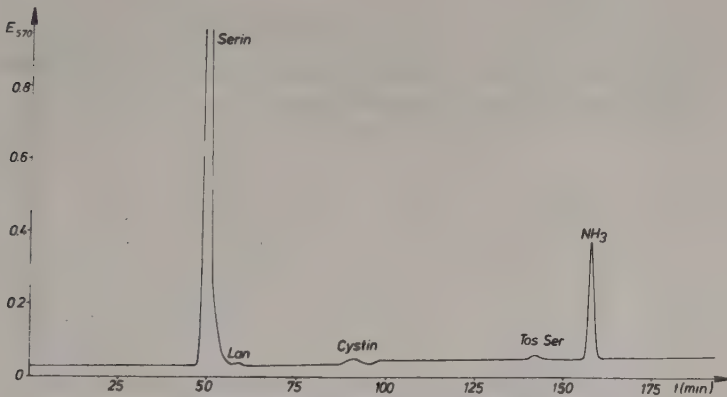


Abb. 4 Aminosäurechromatogramm des vernetzten Poly-L-serins (umgeestert bei pH 9)

Die Cystein-Anteile, bezogen auf das Gesamt-Cystin / Cystein liegen etwa zwischen 5 % beim Copoly-CboLys/Ser (1/1) und 12 % beim Poly-L-serin (Tab.2). Die relativ niedrigen Werte liegen in der Größenordnung wie sie Ch.EBERT (7) beim Kollagen und Seidenfibroin fand. Offenbar treten die Tosylierungs- und Umesterungsreaktionen in gewissen - möglicherweise ungeordneten - Bereichen der β -Struktur gehäuft auf, so daß nur relativ wenige isolierte und daher nicht zum Disulfid oxidierbare freie SH-Gruppen erhalten bleiben. So sind wohl auch die Disulfidbrücken mehr cumuliert als isoliert anzusehen. Interessant ist ferner die Beobachtung, daß mit steigendem Cbo-lysin-Einbau der freie SH-Anteil fällt, obwohl der OH $\rightarrow$ SH -Umsatz unter Berücksichtigung des beim Copolymeren (1/1) geringeren Tosyl-Anteils zunimmt (Tab.2).

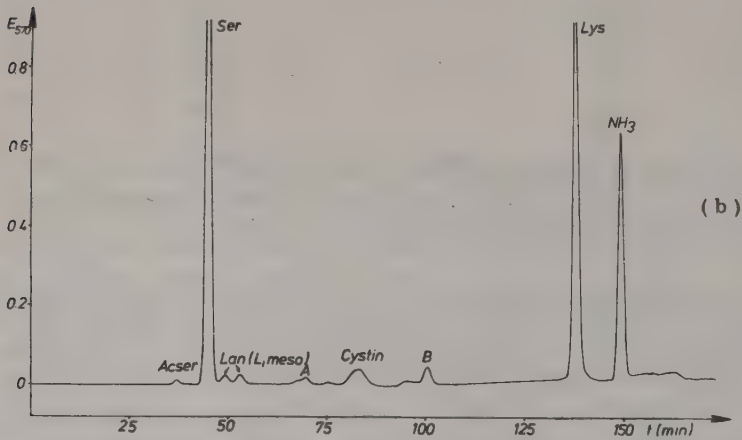
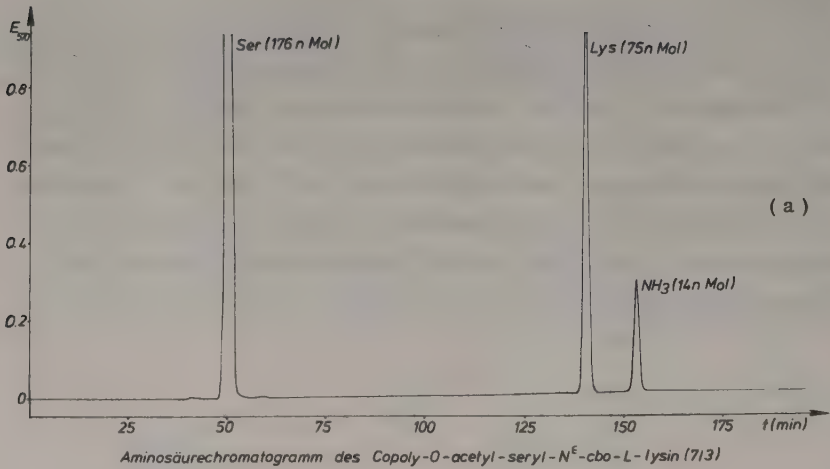


Abb. 5: AS-Chromatogramm des Copoly-O-acetyl-L-seryl-N ϵ -cbo-L-lysin (7/3) (a) und des umgeesterten (4 n CH₃COSK, pH 11) Copoly Ser/Cholys (7/3) (b).

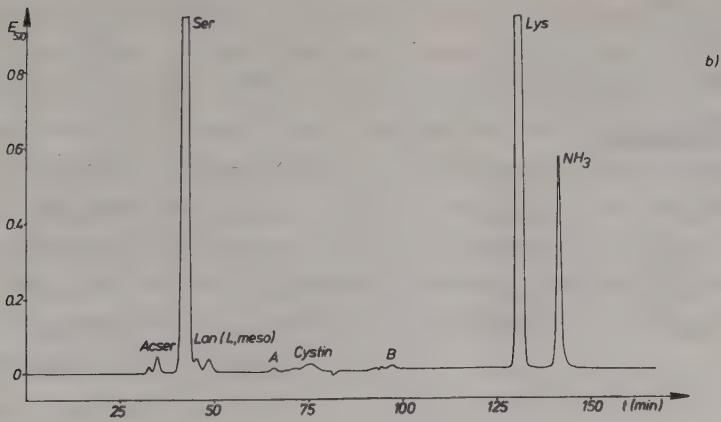
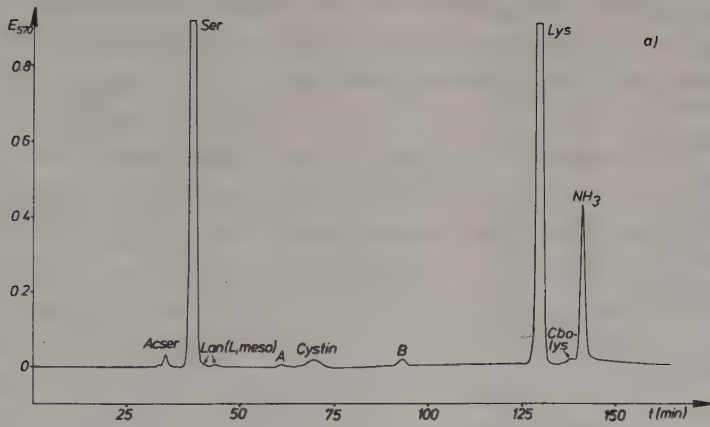


Abb. 6: AS-Chromatogramme des umgeesterten Copoly-Cbo-lys/Ser (1/1);
a) bei pH = 9 b) bei pH = 11 .

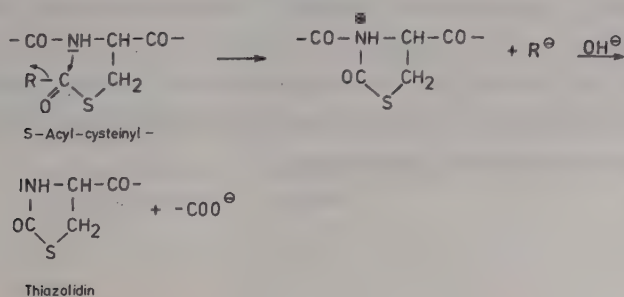
	Vernetztes Polyserin	Vernetztes Copoly-Ser/Cbolys	
		(7/3)	(1/1)
S (Gew.-%)	8,61	8,85	3,31
Cystin/2 + Cystein			
a) (Mol-%)	18,0	25,3	19,6
b) (Mol-%)	14,4	19,5	15,8
Cystein			
a) (Mol-%)	2,2	2,7	1,0
b) (Mol-%)	2,3		
Cystein/Σ Cys			
a) (%)	12,0	10,7	5,1
Lanthionin			
a) (Mol-%)	≈ 2	2,6	2,0
b) (Mol-%)	5,3	5,7	5,2
Cystin + Lan			
a) (Mol-%)	≈ 10	13,8	11,4
b) (Mol-%)	11,3	14,2	11,6
Mittlerer Vernetzungsgrad:			
-S-S- a)	0,080	0,078	0,052
b)	0,066	0,063	0,040
-S- a)	≈ 0,01	0,016	0,010
b)	0,047	0,037	0,026
Σ a)	≈ 0,09	0,094	0,062
b)	0,113	0,100	0,066

Tabelle 2: Schwefel-Aminosäuren-Daten des umgeesterten Poly-L-serin und des Copoly-N^ε-cbo-L-lysyl-L-serin (3/7) und - (1/1). OH → SH bei pH = 9 (a), OH → SH bei pH = 11 (b); die Mol-% sind bezogen auf das vor der Tosylierung vorhandene Serin; Cystin/2 + Cystein (Σ Cys) ist der aminosäurechromatographisch bestimmte Gesamt-Gehalt an Cystin und Cystein; der mittlere Vernetzungsgrad ist angegeben in Brücken / Aminosäurerest.

Der Einbau von statistischen, wahrscheinlich kleinen Cbo-Lysin-Blöcken begünstigt natürlich durch partielle Lockerungen der kompakten β -Struktur OH $\rightarrow$ SH Reaktionshäufungen in bestimmten Bereichen. Bei höherem Cbolys/Ser -Verhältnis werden die absoluten Umsätze (vor allem der Tosyl-Anteil) wieder kleiner, da hier die großen Seitenketten des Cbo-Lysins die Reaktionen sterisch behindern (Tab.2). Für die absoluten OH $\rightarrow$ SH -Umsätze sind wahrscheinlich Ser/Cbolys -Verhältnisse von 0,7 - 0,8 am günstigsten.

Der Disulfid-Vernetzungsgrad beträgt beim bei pH 11 umgeesterten Poly-L-serin 0,066 Brü/AS, beim Copoly-Cbolys/Ser (3/7) 0,063 Brü/AS, d.h. auf etwa 15 Aminosäuren fällt im Mittel 1 Disulfid-Brücke. Beim Copoly-Cbolys/Ser (1/1) ergibt sich wegen des Einbauverhältnisses 1:1 ein niedrigerer mittlerer Vernetzungsgrad von 0,040 Brü/AS, d.h. 1 Brücke auf 25 Aminosäuren. Werden die Lanthionin-Vernetzungen berücksichtigt, so folgt für die umgeesterten Produkte jeweils ein bei pH 9 und pH 11 fast gleicher Vernetzungsgrad. Für Poly-L-serin kommt dann 1 Brücke auf 10 Aminosäuren, für Copoly-Cbolys/Ser (3/7) 10 bis 11 und für Copoly-Cbolys/Ser (1/1) 15 bis 16 (Tab.2).

Aus den elementaranalytisch bestimmten S-Werten errechnen sich nach der Umesterung etwa 10 - 20 % höhere OH $\rightarrow$ SH -Umsätze als die aus den Aminosäure-Analysen bestimmten (Cystin + Cystein + Lanthionin) -Gesamtwerte. Dieses ist wohl in erster Linie darauf zurückzuführen, daß sich nach der Umesterung noch Tosyl-Anteile im Polymeren befinden. Dies zeigen auch einige AS-Chromatogramme und IR-Spektren (Abb.4 und 7). Die Unterschiede der Schwefel-Werte aus Elementaranalyse und Aminosäureanalyse können auch durch Nebenreaktionen mitverursacht werden. So ist z.B. unter den gegebenen Bedingungen Thiazolidin-Bildung aus S-Acetyl-cysteinyl mit anschließender Kettenspaltung möglich. Die Reaktion verläuft nach folgendem Schema (25):



Aus den Aminosäure-Chromatogrammen ergaben sich nun für das Poly-L-serin $\text{OH} \rightarrow \text{SH}$ -Gesamtumsätze (Cys + Lan) bis zu etwa 20 Mol-%, für das Copolymere aus Serin und Cbolysin bis zu etwa 30 Mol-% bei günstigem Einbauverhältnis (7 : 3) - also etwa 10 Mol-% mehr.

SAKAMOTO et al. (11) führten Cellulose durch $\text{OH} \rightarrow \text{SH}$ -Umwandlung in Mercapto-Cellulose über. Hierbei wurde die tosylierte Cellulose durch Kaliumthioacetat nicht in wäßriger Lösung - wie in dieser Arbeit - sondern in organischen Lösungsmitteln (DMF, Methanol, Aceton) umgeestert. Die entstandene Acetylthiocellulose wurde mit 2 n wäßriger NaOH zur Mercaptocellulose hydrolysiert. Die $\text{OH} \rightarrow \text{SH}$ -Umsätze brachten etwa bis 600 μ Mole $\text{SH} + 2 \text{S-S/g}$, was einem molaren Umsatz von etwa 8,5 % der Glycosyl-Reste entspricht, wenn man voraussetzt, daß pro Rest nur eine OH-Gruppe in eine Thiol-Gruppe umgesetzt wird. In diesem Zusammenhang ist die Darstellung der 6-Mercaptocellulose zu erwähnen (11); offenbar ist die Hydroxylgruppe an C-6 für die chemische Modifizierung bevorzugt zugänglich. 50 - 60 % der mercaptylierten Glycosyl-Reste lagen in freier SH-Form vor, während die anderen Disulfid-vernetzt waren. Nach I_2 -Oxidation sank der SH-Anteil auf etwa 5 - 15 %, wobei allerdings weitergehende Oxidationen zur Sulfin- bzw. Sulfonsäure auftraten. Vergleicht man die $\text{OH} \rightarrow \text{SH}$ -Umsätze mit denen der vorliegenden Arbeit, so zeigt sich hier ein etwa 2- bis 3-fach höherer Umsatz, wobei die freien SH-Anteile etwa denen nach der I_2 -Oxidation der Mercaptocellulose entsprechen. Offenbar sind die SH-Gruppen in den hier beobachteten Polypeptiden durch Luft-Sauerstoff leichter oxidierbar als die der Mercaptocellulose, wahrscheinlich erklärbar durch unterschiedliche räumliche Nähe der SH-Gruppen. Möglicherweise spielen auch Nachbargruppeneffekte eine Rolle.

Die vernetzten Polymere sind in den meisten Lösungsmitteln gänzlich unlöslich, in einigen wie DCE und HFIPA nur zum geringen Teil (Tab.3), dadurch waren sie einer Molekulargewichtsbestimmung nicht zugänglich. Die Amid-Banden der IR-Spektroskopie zeigten keine Lageveränderung gegenüber denen der unvernetzten Polymere (Abb.7). Offenbar bleibt die Grundstruktur des β -Faltblattes bei der Vernetzung erhalten. Aus dem IR-Spektrum ist weiterhin die Bande des para-substituierten Benzols zu sehen, was auf noch vorhandene Tosyl-Reste hinweist.

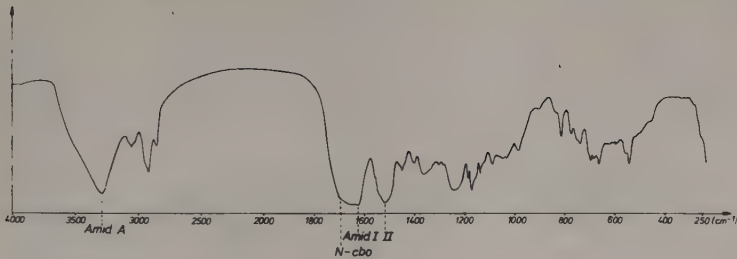


Abb 7 IR-Spektrum der vernetzten Copoly-Cbo (lys/Ser 3:7)
(Umesterung mit $4n \text{ CH}_3\text{COOSK}$; $\text{pH} > 9$)

Das Röntgen-Goniometerspektrum (Abb.9) des vernetzten Copolymeren (7/3) zeigt eine deutliche Intensitätsverringering der Reflexe gegenüber dem unvernetzten Copolymeren. Der abgeschwächte und verbreiterte Hauptreflex erscheint bei kleinerem θ . Andere Verschiebungen sind ebenfalls zu erkennen. Eine Röntgen-Langzeitaufnahme (Abb.8) mit einer Belichtungs- oder Expositionszeit von 15 Stunden läßt allerdings die schwachen Reflexe recht deutlich und scharf erscheinen.

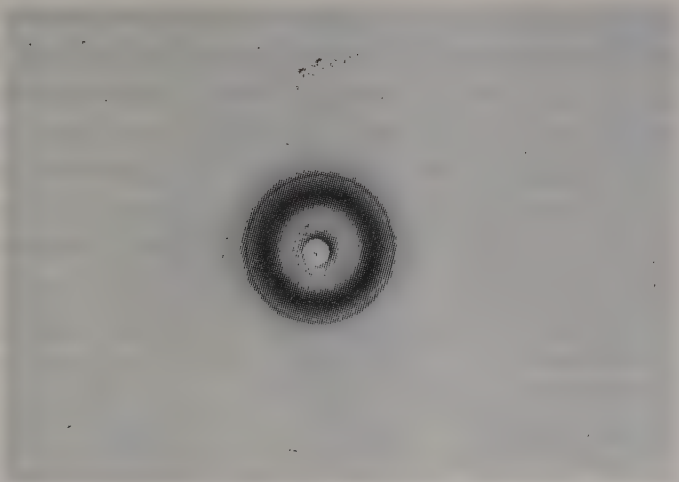


Abb.8: Röntgen-Pulverdiagramm des vernetzten Copoly- N^{ϵ} -cbo-L-lysyl-L-serin (3/7); Aufnahmezeit: 15 Stunden.

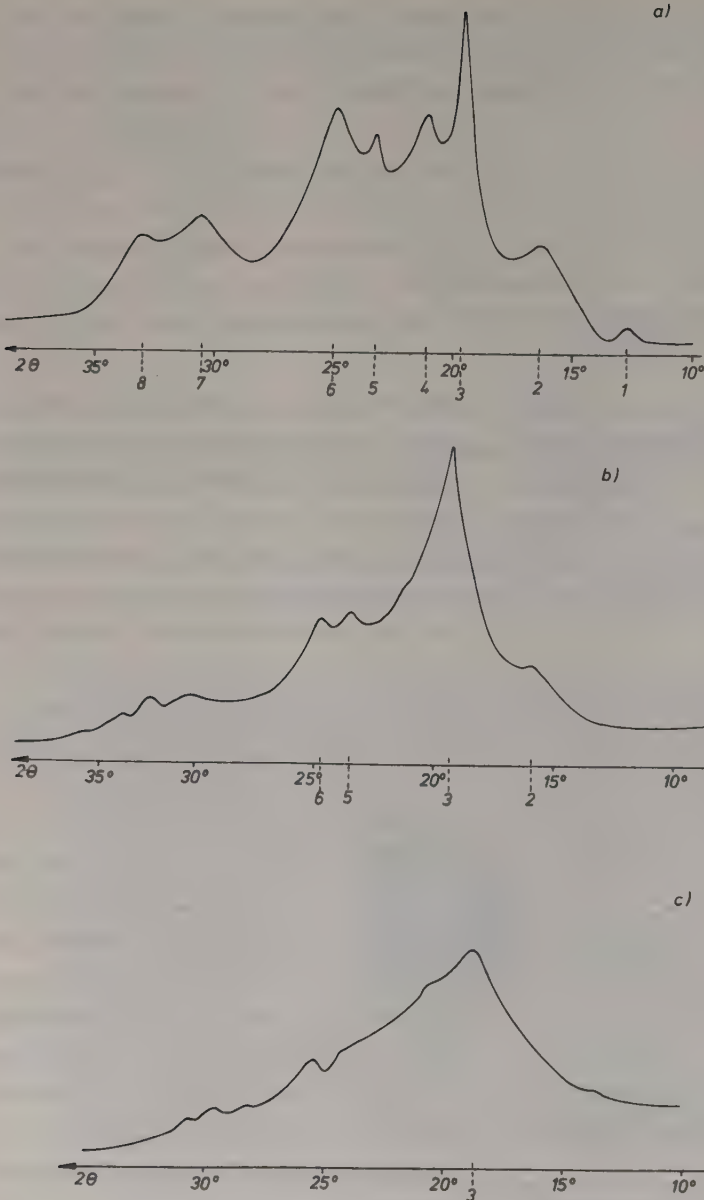


Abb. 9: Röntgen-Goniometerspektren des Poly-L-serins (a), des unvernetzten Copoly-Cbolys/Ser (3/7) (b) und des vernetzten Copolymeren (c). Pulveraufnahmen mit Polyäthylenunterlage.

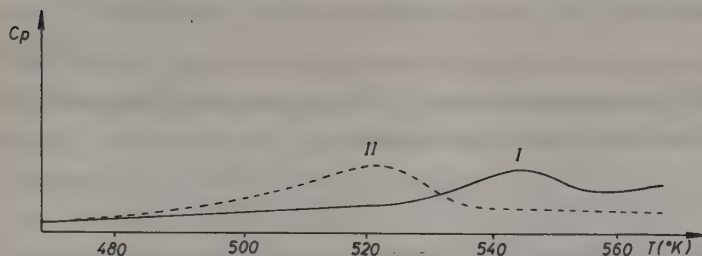


Abb.10: DTA-Diagramm des unvernetzten Copoly-Cbolys/Ser (3/7) (I)
und des vernetzten Copolymeren (II).

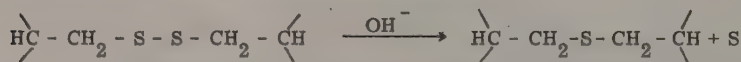
Auf dem Photo ist eine zusätzliche schwache innere Linie zu sehen, der ein Winkel $\theta = 4,8^{\circ}$ und ein $d = 9,3 \text{ \AA}$ zukommt. Aus den Goniometer-Spektren ist ein Shift des Hauptreflex-Peaks von $\theta = 9,8^{\circ}$ ($d = 4,5 \text{ \AA}$) des Poly-L-serins über $\theta = 9,7^{\circ}$ ($d = 4,6 \text{ \AA}$) des unvernetzten Copolymeren zu $\theta = 9,2^{\circ}$ ($d = 4,8 \text{ \AA}$) des vernetzten Copolymeren zu erkennen. Aus den IR- und Röntgendaten ist zu schließen, daß bei der Vernetzung eine gewisse Strukturumordnung erfolgt, wobei allerdings die β -Grundstruktur erhalten bleibt.

Das Differential-Thermoanalysendiagramm des vernetzten und unvernetzten Copoly-Cbolys/Ser (3/7) zeigt in beiden Fällen einen breiten und flachen Umwandlungs-Zersetzungspk, dessen Maxima etwa um 20° differieren. Der des vernetzten Copolymeren liegt tiefer, das System wird trotz interchenarar Brücken offenbar instabiler, wahrscheinlich als Folge partiell zerstörter β -Struktur. Die relativ wenigen kovalenten Vernetzungen machen also die Stabilitätsabnahme durch die verringerte Packungsdichte der Ketten nicht wett.

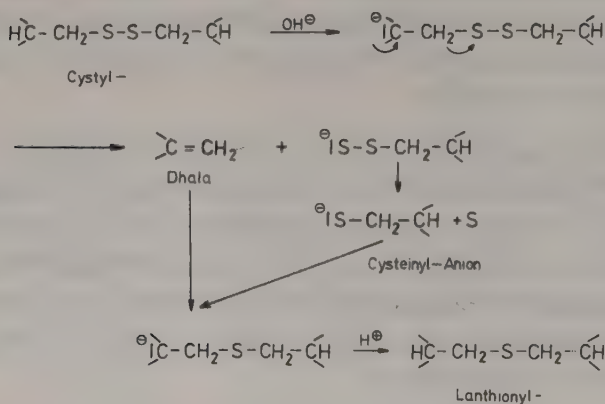
Poly-L-serin	→	Copoly-Cbolys/Ser	→	vernetztes Copolymeres
β -Faltblatt (I)		"aufgelockerte"		umgeordnete
		β -Struktur (II)		β -Struktur (III)

3.1. Lanthionin-Bildung bei der alkalischen Umesterung durch β -Eliminierungsreaktionen

Lanthionin bildet sich bei der alkalischen Behandlung cystinhaltiger Proteine, was zuerst an der Wolle nachgewiesen wurde (1). Es liegt also eine Cystin $\rightarrow$ Lanthionin Umwandlung vor mit der formalen Bruttoreaktion:



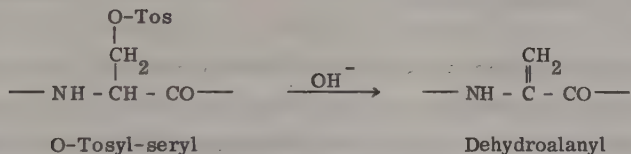
Dadurch werden also im Protein Disulfid-Brücken in Sulfid-Brücken umgewandelt. Der Mechanismus dieser Reaktion beruht nach SWAN (26) auf einer bimolekularen nucleophilen β -Eliminierung, für die nach TARBELL et al. (27-29) das aktivierte H-Atom in β -Position zur Disulfid-Bindung verantwortlich ist. Die Reaktion läuft über das Dehydroalanin (Dhala), welches das entstandene Cysteiny-Anion sofort nucleophil addiert.



Diese Reaktion läuft schon unter recht milden alkalischen - wie in konz. NH_3 - Bedingungen ab. Die Reaktion wird aber anscheinend gehemmt durch Substitution des aktiven H-Atoms. So geht z.B. auch in starken Alkalien das α, α' -Dimethylcystin nur sehr langsam in das entsprechende Lanthionin-Derivat über (26). Die Lanthionin-Bildung läuft offenbar unter Racemisierung ab, da sich im Aminosäurechromatogramm (Abb.11b.u.a.) ein Doppelpeak, der durch chromatographische Auftrennung der Diastereoisomeren L- und meso-Lanthionin entsteht, findet. Der Grund für

die Bildung des meso-Lanthionins liegt in der intermediären Bildung des Dhala, an dessen sp^2 -hybridisiertem C-Atom das Sulfid-Anion des Cysteins von beiden Seiten angreifen kann (7).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Umesterungen zeigt sich für pH = 11 ein Anstieg des Lanthionins und ein Abfall des Cystins gegenüber der bei pH = 9 geführten Reaktion, was durch den obigen Mechanismus zu erklären ist. Allerdings fällt der Lanthionin-Anstieg um etwa 1 - 2 Mol-% größer aus als der Cystin-Abfall. Dies ist wahrscheinlich zurückzuführen auf eine β -Eliminierung des Tosyl-Restes unter alkalischen Bedingungen. PHOTAKI et al. (9) zeigten dies am tosylierten Serin und KOSHLAND (14) bei der Darstellung des Anhydro-Chymotrypsins. Hier zeigte sich in wäßriger Lösung z.B. bei pH = 10 ein Tosyl-Abbau im Chymotrypsin von 15 % in 3,5 h bei 22°C. Diese β -Eliminierung erfolgt wiederum unter Bildung von Dehydroalanin:



Bei Anwesenheit von Thioacylaten wird die β -Eliminierung unterlaufen durch einen direkten O-Tosyl- $\rightarrow$ S-Acyl-Austausch unter Beibehaltung der Konformation (30). So verläuft die eigentliche OH $\rightarrow$ SH -Umwandlung nicht über einen β -Eliminierungs-Additionsmechanismus sondern durch Substitution. Bildet sich daneben aber doch Dehydroalanin, so kann dieses natürlich vorhandene Cysteiny-Anionen nucleophil addieren. Die Konkurrenz dieser beiden Reaktionen wird wahrscheinlich durch ihre unterschiedlichen Geschwindigkeiten zugunsten der Substitution entschieden. So ergab sich für das zu 66 % tosylierte Copoly-Cbols/Ser (3/7) unter Zusatz von Cystein bei pH 11 nur etwa 5 Mol-% Lanthionin (bezogen auf Serin) nach 4 Tagen bei Zimmertemperatur (Abb.10). Dies ist selbst unter Berücksichtigung der heterogenen Reaktionsbedingungen recht wenig.

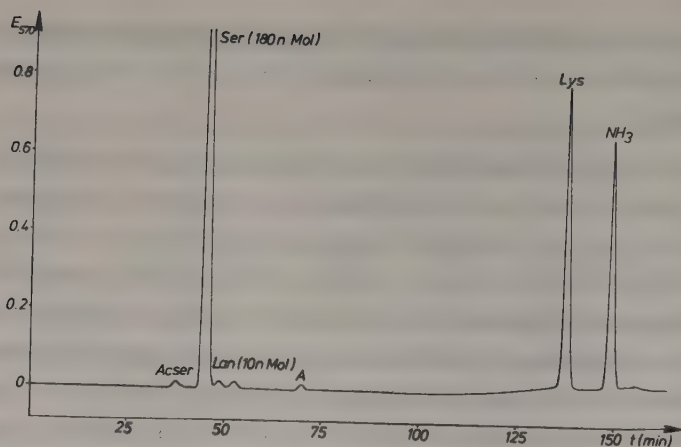


Abb.11: AS-Chromatogramm des mit Cystein umgesetzten tosylierten Copoly-Ser/Cbolys (7/3).

Wie in den vorigen Chromatogrammen zeigt sich auch hier wieder der meso-Lanthionin-Peak. In einem Parallelversuch ergab sich für das bei pH 9 umgeesterte Copolymere (7/3) unter den gleichen Bedingungen wie oben ein Lanthionin-Anstieg von 2,5 Mol-% auf etwa 15 Mol-% mit ebenfalls etwa halbem Anteil an meso-Lanthionin.

4. Darstellung und Vernetzung des Copoly-N^ε-carbobenzoxy-L-lysyl-L-threonin

Die an Serin-Polymeren/Copolymeren eingeführten Vernetzungen durch partielle OH → SH -Umwandlungen werden hier an einem Threonin-Copolymeren in analoger Weise versucht. Als Modellsubstanz diente hierbei das Copoly-N^ε-carbobenzoxy-L-lysyl-L-threonin (1/1). Die Darstellung dieses Copolymeren erfolgte in gleicher Weise wie die der Serin-Copolymeren: 1. Darstellung der N-Carboxyanhydride, des O-Acetyl-L-threonins und des N^ε-Cbo-L-lysins nach dem Fuchs' schen Verfahren mit Phosgen, 2. anionische statistische Copolymerisation in THF und 3. Deacetylierung des erhaltenen Copoly-N^ε-cbo-L-lysyl-O-acetyl-L-threonins.

Die Leuchs' schen Anhydride des O-Acetyl-L-threonins und des N^ε-Cbo-L-lysins wurden etwa im Molverhältnis 1 : 1 in abs. THF copolymerisiert. Als Initiator diente wiederum Pentylamin, die Reaktionszeit betrug 3 Wochen, die Reaktionstemperatur wurde zwischen 35° und 45°C gehalten. Das gebildete Copolymere blieb in Lösung, im Gegensatz zum Poly-O-acetyl-L-serin und dem Copolymeren aus O-Acetylserin und N^ε-Cbo-lysin (siehe auch Kap. 5). Die Polymerisation wurde durch Zugabe von Methanol abgebrochen. Das ausgefällte Copolymerisat war dann nur partiell in THF löslich; jedoch erwies es sich als löslich in Dimethylformamid. So konnte auch eine dampfdruckosmotrische Molekulargewichtsbestimmung in DMF als Lösungsmittel vorgenommen werden. Es ergab sich ein Zahlenmittel von $\bar{M}_n = 8300$, was einem mittleren Polymerisationsgrad von $\bar{P}_n = 42$ entspricht. Der etwas höhere Polymerisationsgrad gegenüber dem des Serin-Copolymeren ist wohl auf die homogene Polymerisation zurückzuführen.

Das IR-Spektrum ähnelt sehr denen der Serin-Copolymeren. Die Lage der Amid-Banden deuten auch hier auf eine β-Struktur hin (Abb. 12). Nach NOGUCHI et al. (31) können beim Poly-O-acetyl-L-threonin in festem Zustand sowohl eine anti-parallele β-Struktur als auch die intrachenare cross-β-Struktur vorliegen.

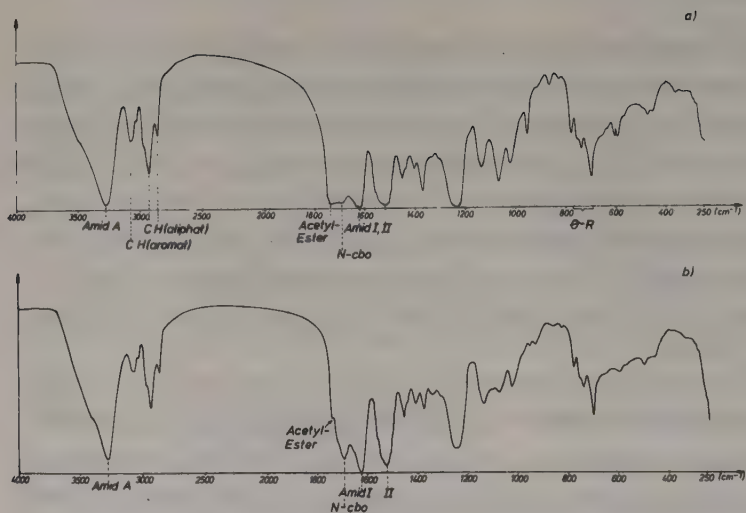
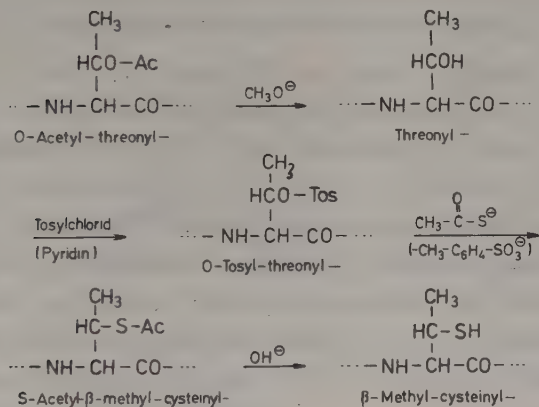


Abb.12: IR-Spektren des Copoly-O-acetyl-L-threonyl-N^ε-cbo-L-lysin (1/1) a) und des partiell deacetylierten Copolymeren b).

Die Deacetylierung mit konz. NH_3 - die im Falle der O-Acetyl-seryl-Reste vollständig verlief - führte beim Threonin-Copolymeren nicht zum Erfolg. Selbst in 2 n $\text{CH}_3\text{O}^-\text{Na}^+$ über 4 Tage waren die Acetyl-Gruppen nicht völlig entfernt (Abb.12). Härtere Bedingungen wurden aber nicht angewendet, da dann ein Kettenabbau befürchtet werden muß. Die Lage der Amid-Banden ändert sich nach der Deacetylierung nicht. Die Röntgen-Pulverdiagramme des Copoly-Cbolys/Acthr und des deacetylierten Copolymeren ähnelten stark denen der entsprechenden Serin-Copolymeren (1/1). Der Hauptreflexring beider acetylierter Copolymeren mit einem etwa gleichen Abstand $d \approx 4,6 \text{ \AA}$ spaltet sich bei der Deacetylierung in beiden Fällen auf in zwei eng benachbarte Reflexringe, von denen der äußere jeweils von starker Intensität mit $d \approx 4,6 \text{ \AA}$ und der innere jeweils von weniger starker Intensität mit $d \approx 4,9 \text{ \AA}$ ist. Zum Vergleich hat das Poly-L-serin einen Hauptreflex mit $d \approx 4,5 \text{ \AA}$ (Tab.1).

Die OH $\rightarrow$ SH -Umwandlung wurde analog dem Reaktionsschema bei den Serin-Polymeren/Copolymeren ausgeführt. Dabei sollte die dem Homocystein isomere β -Mercapto- α -amino-buttersäure (β -Methylcystein) gebildet werden:



Das gebildete β -Methyl-cystein sollte wie beim Cystein $\rightarrow$ Cystin leicht zum β, β' -Dimethyl-cystin oxidiert werden.

Das tosylierte Copolymere hat einen elementaranalytisch bestimmten Schwefelgehalt von $S = 2,03 \%$, was einem Tosyl-Anteil von etwa 30 Mol-% (bezogen auf zu etwa 50 % deacetyliertem Threonin) entspricht. Die unvollständige Deacetylierung, die nicht quantifizierbar ist, bringt hier allerdings einen Fehler von etwa ± 5 Mol-% . Das mit 4 n Kaliumthioacetat bei pH 9 und pH 11 umgeesterte Copolymere hat einen Schwefelwert von $S = 2,3 \%$. Dieser Wert ist deutlich niedriger als der des entsprechenden Serin-Copolymeren (1/1) von $S = 3,3 \%$ (Tab.2).

Das β, β' -Dimethyl-cystin sollte im Aminosäureanalysator-Chromatogramm etwas vor dem Peak des Cystins erscheinen; tatsächlich zeigen sich drei kleine flache Peaks in diesen Positionen. Die zahlreichen isomeren Formen (meso- bzw. allo) des β, β' -Dimethyl-cystins verursachen wahrscheinlich neben der Verbreiterung - wie beim Cystin-Peak - ein Splitting - wie beim Lanthionin im Aminosäure-Chromatogramm.

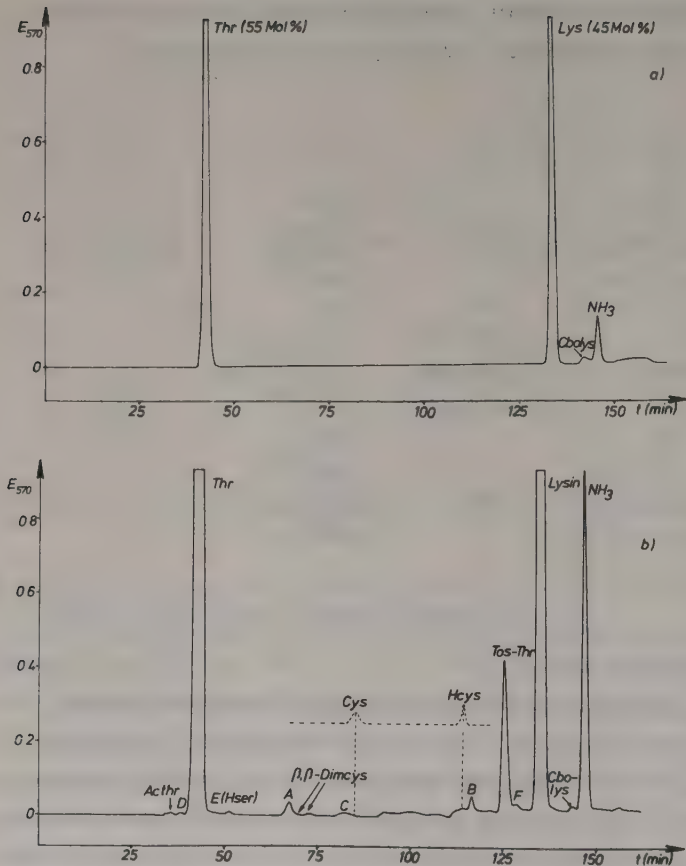


Abb. 13: AS-Chromatogramm von Copoly- N^{ϵ} -cbo-L-lysyl-L-threonin a) und des umgeesterten Copolymeren b).

Die zwei etwas größeren unbekannten Peaks (A, B) sind keine Umesterungsprodukte sondern Artefakte der Threonin-Tosylierung, was aus entsprechenden Aminosäure-Chromatogrammen hervorgeht (siehe auch 4.2.). Die Umesterung verläuft beim Threonin-Copolymeren nur mit äußerst geringen Umsätzen. Sie können aus den Chromatogrammen als höchstens 2 - 3 % des Threonins abgeschätzt werden. Die S-H-Bestimmung nach ELLMAN (24) ergab einen Wert von 1,2 % d. Thr. So liegt also etwa die Hälfte des umgeesterten Produktes in der nichtoxidierten Form

als β -Mercapto- α -amino-buttersäure-Rest vor. Der wesentlich höher liegende elementaranalytisch bestimmte Schwefel-Wert geht auf einen nach der Umesterung noch vorhandenen größeren Tosyl-Anteil zurück (Abb.12 b).

4.1. Diskussion der bei der OH $\rightarrow$ SH -Umwandlung des Threonins möglichen Reaktionswege und der hierbei anfallenden seltenen Aminosäuren

Die Umesterung am Threonin läßt eine größere Varianz der möglichen Reaktionswege und vor allem der gebildeten Produkte zu als dies bei der OH $\rightarrow$ SH -Umwandlung des Serins der Fall ist. Grundsätzlich ist auch bei der alkalischen Umesterung des tosylierten Threonins mit Thioacylaten die Konkurrenz der nucleophilen Substitutions- und der nucleophilen β -Eliminierungsreaktion zu erwarten. Während bei der bevorzugten Substitution (siehe 3.2.) das β -Methyl-cystein bzw. dessen Oxi-dationsprodukt, das β, β' -Dimethylcystin gebildet wird, entstehen bei der β -Eliminierung durch die mögliche intermediäre Bildung von zwei verschiedenen Dehydro- α -amino-buttersäuren, die allerdings in tautomerem Gleichgewicht stehen, eine Reihe von additiven Endprodukten:

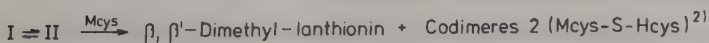
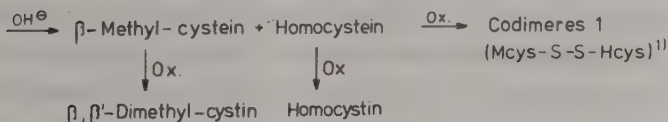
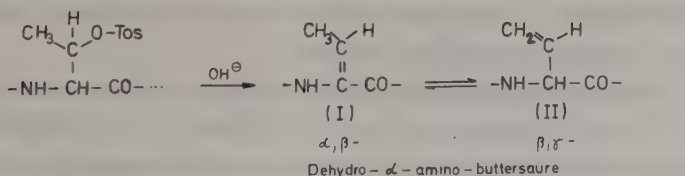


Abb.14: β -Eliminierung von O-Tosyl-threonin, Additionsprodukte.

- 1) [S-(1-Methyl-2-amino-2-carboxy)-äthyl]- γ -dithio- α -amino-buttersäure
- 2) [S-(1-Methyl-2-amino-2-carboxy)-äthyl]-homocystein.

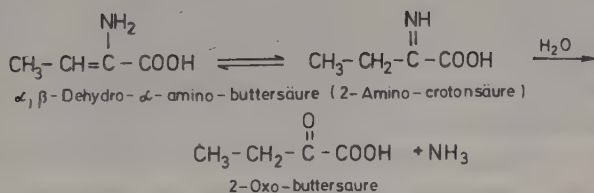
Die in Abb. 12b erscheinenden zwei kleinen Peaks zwischen dem Peak A und der Cystin-Position dürften den Isomeren des β, β' -Dimethyl-cystins zuzuordnen sein. Das Homocystin müßte kurz vor dem Peak B erscheinen (Test), was allerdings nicht eindeutig zu erkennen ist. Aus der Erkenntnis, daß einerseits eine Kettenverlängerung durch CH_2 -Einheiten ein Peak-Shift nach größeren Elutionsvolumina im AS-Chromatogramm bedeutet, wie es z.B. das System Cystin/Homocystin zeigt, aber andererseits die Einführung einer Methyl-Gruppe in β -Stellung wie beim Serin/Threonin oder Lanthionin/ β -Methyl-lanthionin (2) einen Shift zu kleineren Elutionsvolumina bewirkt, ist zu erwarten, daß der Peak des Codimeren 1 (Abb. 13) etwa in der Cystin-Position erscheint. Tatsächlich ist dort ein sehr kleiner breiter Peak C zu erkennen. Dieser wurde deutlicher an einer $\text{OH} \rightarrow \text{SH}$ -Umwandlung am tosylierten monomeren Threonin. Die Bildung des Codimeren 1 und des Homocystins wären ein Beweis für die β -Eliminierung und die intermediäre Bildung der β, γ -Dehydro- α -amino-buttersäure (α -Amino-vinylelessigsäure; Abb. 14) bei der alkalischen Umesterung des tosylierten Threonins. Bei der Cystin $\rightarrow$ Lanthionin analogen Umwandlung des β, β' -Dimethyl-cystins würden das β, β' -Dimethyl-lanthionin und ein Codimeres 2 ($\text{S}-[1\text{-Methyl-2-amino-2-carboxy}]\text{-\u00e4thyl-homocystein}$ (Abb. 14) entstehen, nicht aber das Homolanthionin. Dieses könnte nur durch Addition von gebildeten Homocystein an die α -Amino-vinylelessigsäure entstehen.

Wie das β, β' -Dimethyl-cystin bildet auch das β, β' -Dimethyl-lanthionin wegen der vier chiralen C-Atome 16 Stereoisomere, darunter die meso- und allo-Formen. Das meso-Lanthionin trennt sich von den D, L-Isomeren im AS-Chromatogramm ab (Abb. 11); so ist dies auch für das meso- β, β' -Dimethyl-lanthionin zu erwarten. Nach den obigen Überlegungen sind die Peaks des β, β' -Dimethyl-lanthionins im AS-Chromatogramm vor denen des Lanthionins zu erwarten. Abb. 13b zeigt mehrere kleine Peaks im Bereich (D); hier wird aber teilweise überlagert durch den Threonin- und den möglichen O-Acetyl-threonin-Peak. Ein wenig weiter rechts im Chromatogramm müßten die Peaks des Codimeren 2 erscheinen.

Ein weiterer möglicher Hinweis für die intermediäre Bildung der α -Amino-vinylelessigsäure ist der kleine Peak E; denn dieser fällt exakt mit der Position des Homoserins zusammen, was aus dem Chromatogramm 13b des Hydrolysats mit zugesetztem Homoserin hervorging. Allerdings könnte der Peak E auch dem Codimeren 2 zuzuordnen sein. Das Auftreten des Homoserins würde auch ein Beweis für die Bildung von Hydroxy- α -aminosäuren aus Dehydro- α -aminosäuren durch H_2O -Addition sein.

Dieses wurde von G. ROSSMEISL (32) am System Dehydroalanin/Serin bei einem dehydroalaninhaltigen Trimeren nachgewiesen.

Ein direkter Nachweis der Dehydro- α -amino-buttersäure im Aminosäure-Chromatogramm ist nicht möglich, da diese bei der Hydrolyse analog der Dehydroalanin $\rightarrow$ Brenztraubensäure -Umwandlung in die entsprechende α -Ketosäure übergeht (33):



5. Löslichkeiten der vernetzten und unvernetzten Polypeptide

Optisch reines Poly-L-serin ist in Wasser wie in den meisten organischen Lösungsmitteln unlöslich; allerdings löst es sich in 7 - 8 m LiBr glatt (21). Poly-D, L-serin dagegen ist wasserlöslich (15). Dies ist der Grund dafür, daß bei der alkalischen Deacetylierung des Poly-O-acetyl-L-serins - wobei partielle Racemisierung eintritt - ein je nach D-Serin-Anteil mehr oder weniger wasserlösliches Polyserin entsteht. Bei der in dieser Arbeit mit 25 %-igem NH_3 durchgeführten Deacetylierung blieb die Wasserunlöslichkeit bis auf einen kleinen niedermolekularen Anteil erhalten, was eine Beibehaltung der Konformation bedeutet. Dieser kleine Oligomeren-Anteil betrug etwa 10 % und hatte einen mittleren Polymerisationsgrad von $\bar{P}_n = 10$. Er wurde gelchromatographisch vom Monomeren abgetrennt (Abb. 15).

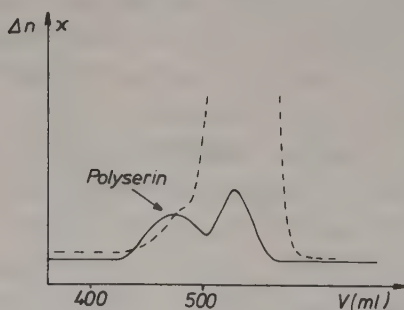


Abb. 15: Gelchromatogramm von wasserlöslichem Polyserin/Monomeren.
Gel: Sephadex G-50; Säule: 2,5 x 100 cm; Puffer: Phosphat, $I = 0,15 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4/\text{l}$, $\text{pH} = 7,0$; Flow rate = 25 ml/h; — = Diff. Brechungsindex Δn , - - - - = elektr. Leitfähigkeit κ .

Das Poly-O-acetyl-L-serin und die dargestellten Copolymeren sind in Wasser und wäßriger 7,5 m LiBr-Lösung unlöslich (Tab. 3). Einige der dargestellten Polymeren/Copolymeren zeigen in organischen Lösungsmitteln wie Benzol und DMF eine partielle Löslichkeit. Die unvernetzten Cbo-Lysin-Copolymeren zeichnen sich durch ein starkes Quellverhalten in aromatischen Lösungsmitteln aus. Alle hier beschriebenen unvernetzten Polymeren und Copolymeren sind löslich in DCE,

TFE und Hexafluorisopropanol. Im Gegensatz zu den Serin-Copolymeren ist das Copoly-N^ε-cbo-L-lysyl-O-acetyl-L-threonin in DMF löslich (Tab.3). Während der Polymerisation blieb es auch in THF löslich (siehe Kap.4.).

Die vernetzten Polymeren und Copolymeren waren in allen angewendeten Lösungsmitteln entweder unlöslich oder in DCE, TFE und HFIPA teilweise löslich. Lediglich das vernetzte Threonin-Copolymere zeigte auch in DMF partielle Löslichkeit, wohl auf Grund seines geringen Vernetzungsgrades. Umgekehrt ist diese Nicht-Löslichkeit auch ein Beweis für das Vorhandensein kovalenter Schwefel-Vernetzungen, durch deren Einführung in Form von Disulfid- bzw. Sulfid-Brücken auch gut lösliche Polymere zu gänzlich unlöslichen Produkten werden. Dies zeigt sich auch im Falle des umgeesterten Poly-O-acetyl-threonins (Tab.3).

Es sei hier erwähnt, daß bei Entfernung der Carbobenzoxy-Gruppen des Lysins die unvernetzten Copolymeren wasserlöslich werden, die vernetzten aber unlöslich bleiben (siehe Kap.6.).

Substanz:	Lösungsmittel:					
	H ₂ O	7,5 m-LiBr	Benzol	DMF	DCE	HFIPA ¹⁾
Poly-L-serin (u)	o ²⁾	+	-	-	+	+
(v)	-	-	-	-	o	o
Poly-O-ac-L-serin	-	-	-	o	+	+
Copoly-N ^e -cbo-L-lysyl-L-serin						
(3/7) (u)	-	o	-	-	+	+
(v)	-	-	-	-	o	o
—(1/1) (u)	-	o	-	-	+	+
(v)	-	-	-	-	o	o
Copoly-N ^e -cbo-L-lysyl-O-ac-L-serin (3/7)	-	-	o ³⁾	o	+	+
—(1/1)	-	-	o ³⁾	o	+	+
Copoly-N ^e -cbo-L-lysyl-O-ac-L-threonin (1/1)	-	-	o ³⁾	+	+	+
Copoly-N ^e -cbo-L-lysyl-(O-ac)- ⁴⁾ L-threonin (1/1)						
(u)	-	-	o ³⁾	+	+	+
(v)	-	-	-	o	o	o

Tab.3: Löslichkeiten von unvernetzten (u) und vernetzten (v) Polymeren und Copolymeren;
 - = unlöslich,
 + = löslich, o = partiell löslich; 1) Hexafluorisopropanol 2) vom Poly-L-serin ($\bar{P} \approx 50$) waren etwa 10 % wasserlöslich ($\bar{P} \approx 10$) 3) quillt stark 4) partiell deacetyliert.

6. Enzymatischer Abbau am vernetzten Copoly-Ser/Lys (7/3) und - (1/1)

Die Frage nach der Abbaufähigkeit schwefelvernetzter Polypeptide durch Enzyme wurde hier durch Trypsin-Hydrolysen an den dargestellten Copolymeren aus Serin und Lysin zu beantworten versucht. Ein Vergleich mit den unvernetzten Copolymeren war nicht möglich, da die vernetzten Produkte auch nach der Entfernung der Carbobenzoxy-Gruppen des Lysins wasserunlöslich bleiben. Die Cbo-Gruppen wurden hier mit 6 n HCl in 50 %-igem Äthanol bei Zimmertemperatur entfernt (34). Die Trypsin-Hydrolysen wurden in Tris-Puffer pH 8,1 bei 20°C in Anwesenheit von Ca^{++} durchgeführt. Nach jeweils 4 h und 20 h wurden Proben zur Aminosäureanalyse entnommen. Die Chromatogramme des hydrolysierten Copoly-Ser/Lys (7/3) und des - (1/1) zeigen starke qualitative Ähnlichkeit; die 4 h -Hydrolysen zeigen in ihrer Quantität jedoch deutliche Unterschiede (Abb.16,17). So ist nach 4 h Hydrolyse beim Copoly- (1/1) etwa 2,5mal soviel Lysin freigesetzt worden wie beim - (7/3). Ähnliches gilt für den großen Peak A. Trypsin spaltet die Copolymeren am Carboxyl der Lysin-Reste. Die Peaks, die sich im Chromatogramm um das Lysin gruppieren, sind somit im wesentlichen oligomere Abbauprodukte der Reihe $(\text{Ser})_n\text{-Lys}$. Daneben sind hier auch Cystin- und Lanthionin-haltige Oligomere zu erwarten. Der Peak A wird von einem kleinen Trispuffer-Peak überlagert; der NH_3 -Peak fällt mit dem Trypsin-Peak zusammen. Der kleine Serin-Peak ist durch Abspaltung CO_2 -terminalen Serins, welches Lysin in Nachbarstellung hat, zu erklären. Der breite Peak B kann eigentlich nur Serin-Oligomere anzeigen, die durch ebensolche endständige Spaltung entstanden sind. Der Peak C, der ein recht saures Peptid anzeigt, kann durch die Trypsin-Spaltung alleine nicht erklärt werden. Die Acidität könnte durch eine Sulfon- oder Sulfin-Gruppe hervorgerufen werden, welche durch Oxidation von Cystin entstanden sind.

Die Frage, ob eine Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit vom Vernetzungsgrad der Polymeren vorliegt, kann an Hand der 4 h- und 20 h-Hydrolysen bejaht werden. Während sich nach 20 h für die Copolymeren (7/3) und (1/1) eine etwa gleiche Lysin-Endkonzentration von ca. $2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l zeigt, ist nach 4 h das Konzentrationsverhältnis etwa 1:2,5 (Abb.16). Die etwa gleichen Endkonzentrationen an entstandenem Lysin zeigen, daß der unterschiedliche Lysin-Anteil der beiden Copolymeren keinen wesentlichen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Lysin-Bildung hatte.

Ähnliches gilt für die übrigen Abbauprodukte. Das Copoly-Ser/Lys (7/3) hat einen mittleren Vernetzungsgrad von etwa 0,1 Brücken/Reste, Copoly-Ser/Lys (1/1) von etwa 0,07 (Tab.2). Der Anstieg des Vernetzungsgrades von 0,07 $\rightarrow$ 0,10 hat also eine Abnahme um das 2 bis 2 1/2-fache der Geschwindigkeit der Trypsin-Hydrolyse zur Folge, wenn als Konzentrationsparameter das freigesetzte Lysin herangezogen wird (Abb.16). Quantitative Zusammenhänge zwischen Vernetzungsgrad und Hydrolysegeschwindigkeit sind hier natürlich wegen der Heterogenität des Systems und der Vielzahl der Reaktionsprodukte recht problematisch. Die Mengen des nach 20 h entstandenen monomeren Lysins betrug etwa 0,3 - 0,5 % der Lysin-Anteile der eingewogenen Copolymeren. Bestimmt man aus Abb.17 halbquantitativ das Verhältnis von abgebautem Lysin und der Summe aller anderen Abbauprodukte, so ergibt sich ein sehr kleiner Wert. Aus diesen beiden Ergebnissen ist zu schließen, daß nur ein sehr kleiner Teil des in den Copolymeren enthaltenen Lysins in Blöcken vorliegt. Offenbar ist die statistische Verteilung der Monomer-Reste doch größer als zunächst angenommen. Für das Copoly-Ser/Lys (1/1) (d.h. 45/55) bedeutet dies einen hohen Kettenanteil an alternierenden Serin- und Lysin-Resten.

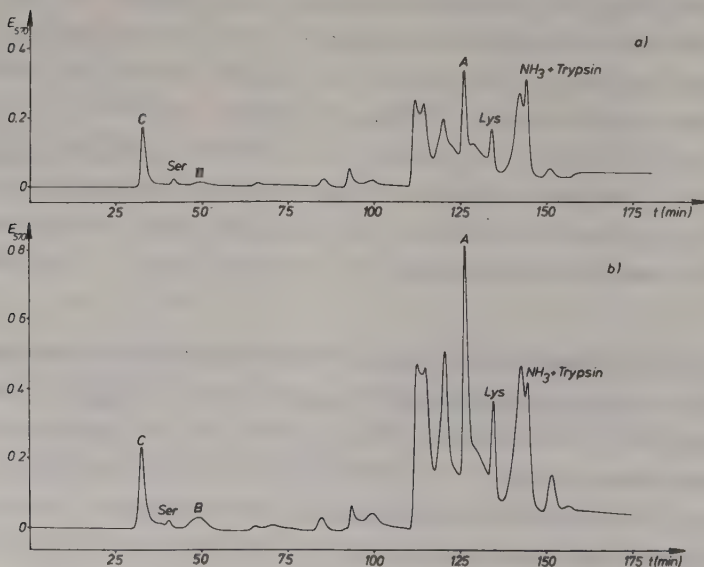


Abb.16: AS-Chromatogramme von Trypsin-Hydrolysaten des Copoly-Ser/Lys (7/3) a) und des Copoly-Ser/Lys (1/1) b); Hydrolysenzeit: 4 h.

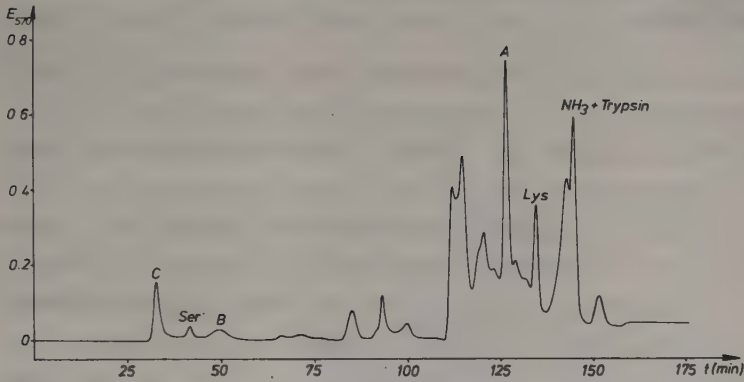


Abb.17: AS-Chromatogramm von Trypsin-Hydrolysaten des Copoly-Ser/Lys (7/3);
Hydrolysenzeit: 20 h.

So entstände unter den Abbauprodukten ein hoher Anteil an Seryl-Lysin, das offenbar durch den großen Peak A in den Aminosäurechromatogrammen (Abb.16,17) angezeigt wird. Zudem hat er als einziger der größeren Peaks einen Extinktionsquotienten E_{570} / E_{440} , der im Wert 4,8 dem Mittel aus den Extinktionsquotienten des Lysin-Peaks 3,0 und des Serin-Peaks 6,5 entspricht.

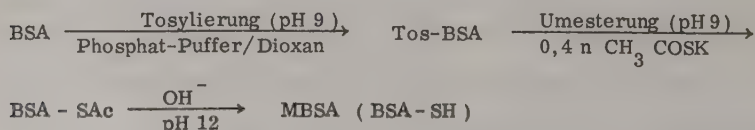
7. Einführung von zusätzlichen Disulfid-Brücken in Serum-Albumin - interchenare Brückenbildung

Ein weiterer Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, ob und in wie weit es möglich ist, $\text{OH} \rightarrow \text{SH}$ -Umwandlungen an natürlichen wasserlöslichen globulären Proteinen vorzunehmen. In diesem Zusammenhang sei nochmals auf die Umwandlung des aktiven Serins des Subtilisins in Cystein hingewiesen (13).

In dieser Arbeit wurde nun zur Umwandlung Rinder Serum-Albumin (BSA) der Firma MERCK verwendet. Dieses besitzt in seiner natürlichen Form schon 17 Cystin-Brücken (8). Eine wichtige Frage ist nun, ob es die Einführung weiterer Brücken gestattet, ohne seine Struktur wesentlich zu verändern. Das Molekulargewicht des BSA wurde mit der analytischen Ultrazentrifuge zu $M_{uz} = 6 \cdot 10^4$ bestimmt (Literaturwerte für Humanserum-Albumin: $M = 6,5 - 6,9 \cdot 10^4$).

Wie bei den obigen synthetischen Polypeptiden und in der Literatur (9-14) besteht der erste Schritt der Umwandlung in einer Tosylierung der OH-Gruppen des Serins, wobei hier auch möglicherweise das Threonin (siehe Kap.4.) und das Tyrosin eine Umwandlung erfahren können. Im Gegensatz zur Tosylierung der dargestellten Polypeptide mit Tosylchlorid in Pyridin wurde hier am natürlichen System unter milderen Bedingungen in Phosphat-Puffer/Dioxan bei pH 9 tosyliert, wie auch Ch. EBERT (7) bei der $\text{OH} \rightarrow \text{SH}$ -Umwandlung am Kollagen und Seidenfibroin verfuhr. Dies geschah hier aber auch aus Löslichkeitserwägungen.

Die Umesterung des tosylierten Serum-Albumins (Tos-BSA) wurde in wäßriger 0,4 n Kaliumthioacetat-Lösung bei pH 9 und Zimmertemperatur durchgeführt. Tosylierung wie Umesterung wurden hier in wesentlich kürzerer Zeit durchgeführt als unter der heterogenen Reaktionsführung bei der Umwandlung der Polypeptide. Das umgeesterte Serum-Albumin (BSA-SAc) wurde dann kurzzeitig (ca. 1 h) einer alkalischen Hydrolyse ($\text{pH} \approx 12$) unterworfen zur restlosen Entfernung der S-Acetyl-Reste. Das entstandene modifizierte Rinder Serum-Albumin (MBSA oder BSA-SH) wurde über Sephadex G 200 von dem niedermolekularen abgetrennt.



Das Gelchromatogramm (Abb.18) zeigt, daß nur ein sehr kleiner Teil als monomeres MBSA vorliegt. Offenbar haben sich durch interchenare Vernetzungen größere Aggregate gebildet.

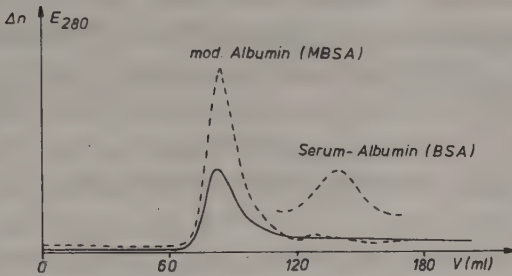


Abb.18: Gelchromatogramm des modifizierten Rinderserum-Albumins (MBSA). BSA-Peak aus Testchromatogrammen. Gel: Sephadex G 200; — = UV (E_{280}), ---- = Diff. Brechungsindex Δn .

Das modifizierte Serum-Albumin zeigte beim Sedimentationslauf in der analytischen Ultrazentrifuge einen leicht asymmetrischen Peak mit scharfem Maximum (Abb.19), dem ein Sedimentationskoeffizient von S_{20} (1 % w NaCl) = $9,9 \cdot 10^{-13}$ sec zukommt.

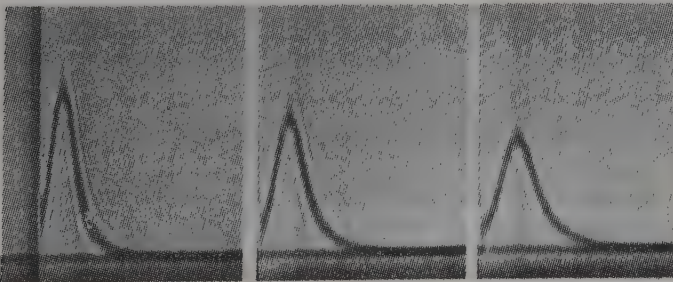


Abb.19: Sedimentationslauf von MBSA in 1 %-iger NaCl-Lösung bei 60 000 UpM bei 21,5 °C; $\Delta t = 2$ bzw. 4 min.

Der Sedimentationskoeffizient des natürlichen Rinderserum-Albumins wurde mit $S_{20} (1\% \text{ w NaCl}) = 4,2 - 4,4 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$ bestimmt. Der Literaturwert für das Humanserum-Albumin beträgt $S_{20,w} = 4,6 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$ (35). Das Molekulargewicht des modifizierten Serum-Albumins wurde ultrazentrifuganalytisch bestimmt zu $M_{uz} = 1,22 \cdot 10^5$; der Wert liegt also doppelt so hoch wie der des BSA. Dieses Ergebnis und der recht scharfe Peak beim S-Lauf zeigen, daß die Modifizierung des BSA unter Dimerisierung verlaufen ist. Ein kleiner Teil ist offenbar zu größeren Aggregaten umgesetzt. Die Bildung von größeren Aggregaten zeigte sich bei längerem Stehenlassen - z.B. bei $+5^\circ\text{C}$ ca. 1 Woche - des MBSA in 1%-iger wäßriger NaCl-Lösung durch Trübung. Der S-Lauf von natürlichem BSA mit zugesetztem MBSA zeigt eine deutliche Schulter des Peaks (Abb. 20). Aus diesem Lauf ergaben sich die S-Werte von $S_{20}^1 (1\% \text{ w NaCl}) = 4,4 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$ für das BSA und $S_{20}^2 (1\% \text{ w NaCl}) = 9,9 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$ für das MBSA. Die Dimerisierung von natürlichem BSA in wäßriger Lösung ist von WILLIAMS et al. (36) untersucht worden.

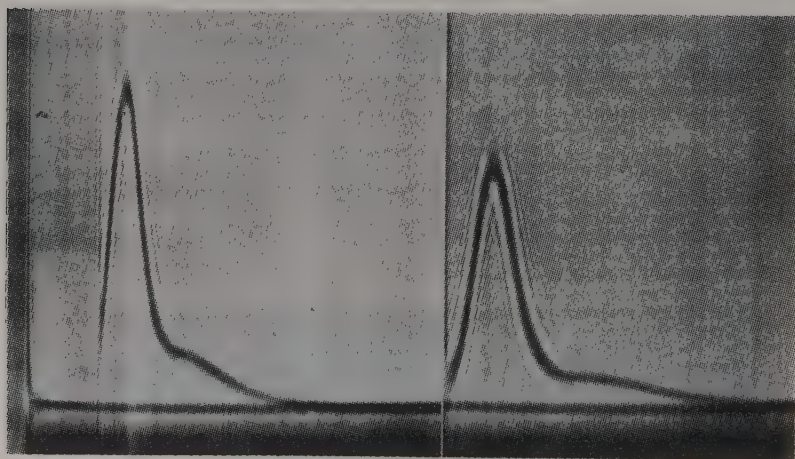


Abb. 20: Sedimentationslauf von BSA und MBSA (Schulter) in 1%-iger NaCl-Lösung bei 48 000 UpM bei 20°C ; $\Delta t = 4 \text{ min}$.

Dies geschieht fast ausschließlich im pH-Bereich unterhalb des isoelektrischen Punktes des BSA, optimal bei etwa pH 3,3. Dies ist also bei den hier angewendeten Bedingungen von $\text{pH} \approx 7$ nur in sehr untergeordnetem Maße zu erwarten. Natürliches Serum-Albumin hat etwa 0,5 - 1,0 freies SH/Mol (37). Hier wurde es durch Ellman-Analyse (24) mit 0,6 Mol-% bestimmt. Die Dimerisierung des BSA ist

gebildet hat, als sich das Serin (+ Threonin) verringerte. Die Frage nach dem Verhältnis von freiem SH zum gebildeten Cystein/Cystin ist wegen der Verschiebungen in der Aminosäure-Zusammensetzung (Tab.4) nicht genau bestimmbar.

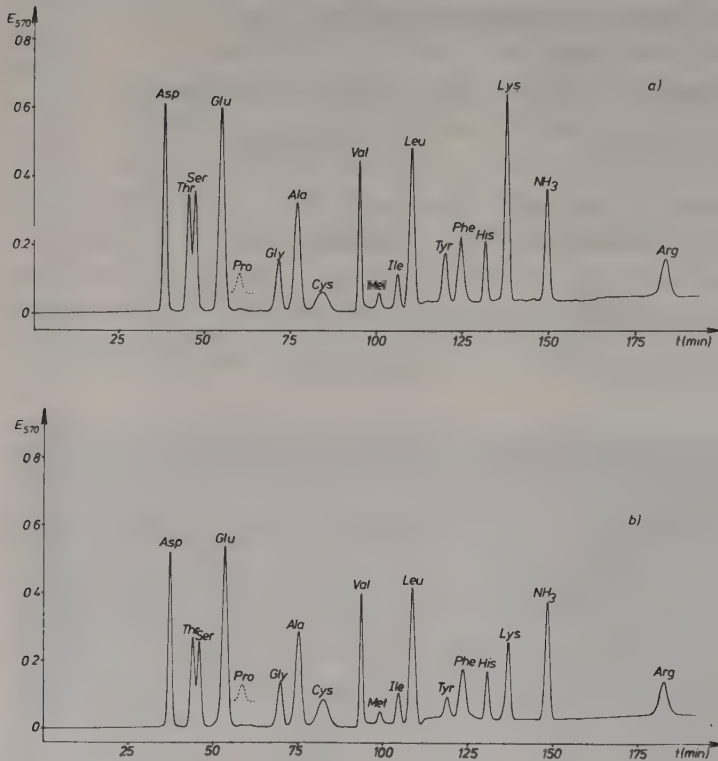


Abb.21: AS-Chromatogramme von Rinderserum-Albumin a) und modifiziertem BSA b).

Es dürfte aber etwa bei 50 % liegen und ist damit um das 5-10-fache größer als bei den vernetzten Poly- α -amino-säuren (Tab.2). Allerdings sind beim MBSA auch freie SH-Anteile aus nicht-Cystein-Resten zu berücksichtigen. Das prozentuale Verhältnis von freiem SH zum gesamten Cystin + Cystein liegt bei etwa 20 %. Aus Abb.21 ist zu ersehen, daß sich der Serin-Anteil bei der Modifizierung des BSA stärker verringert als der Threonin-Anteil. Dies geht noch deutlicher aus Tabelle 4

hervor. Der 50 %-ige Abbau des Tyrosins zeigt sich wie beim Lysin im wesentlichen schon nach der Tosylierung. Die theoretischen OH $\rightarrow$ SH -Umwandlungsprodukte des Tyrosins, das 4-Mercapto-phenylalanin bzw. dessen Oxidationsprodukt, das 4,4'-Dithio-bis-phenylalanin, erscheinen im AS-Chromatogramm nicht.

Aminosäuren	BSA Mol-%	MBSA Mol-%
Asparaginsäure + Asparagin	8,2	9,6
Threonin	6,3	6,1
Serin	6,2	5,0
Glutaminsäure + Glutamin	14,0	15,0
Prolin	5,0	5,1
Glycin	3,2	3,6
Alanin	8,0	8,8
Cystin + 1/2 Cystein	4,3	7,1
Valin	5,8	6,0
Methionin	0,6	0,7
Isoleucin	2,1	1,9
Leucin	11,0	10,9
Tyrosin	3,2	1,6
Phenylalanin	4,8	4,8
Histidin	3,0	2,8
Lysin	9,0	4,4
Arginin	4,5	4,3
	Σ 99,7	98,2

Tabelle 4: Aminosäuren-Zusammensetzung von Rinderserum-Albumin (BSA) und modifiziertem Rinderserum-Albumin (MBSA). Die Zahlen sind Mittelwerte aus drei handausgewerteten Chromatogrammen; mittlerer Fehler $\approx \pm 2\%$.

Die Bildung des 4-Mercapto-phenylalanins durch eine nucleophile Substitution wäre auch kaum denkbar. Umesterungsprodukte des Threonins - wie in Abb. 13b gezeigt - sind hier wegen der Überlagerung der Aminosäuren auch bei größerer Chromatogrammkonzentration kaum auszumachen.

Die durch die Modifizierung des Rinderseum-Albumins bewirkte Änderung an α -helicalen Anteilen ist offenbar nicht sehr evident. So sind die CD-Spektren des BSA und des MBSA in wäßriger Lösung nur geringfügig verschieden. Die breiten negativen Banden lassen in der Lage des Maximums und der Schulter die für die α -Helix charakteristischen Banden bei 206 und 218 nm erkennen. Sie erscheinen für das MBSA etwas deutlicher - besonders im Spektrum II b) erkennbar (Abb. 22).

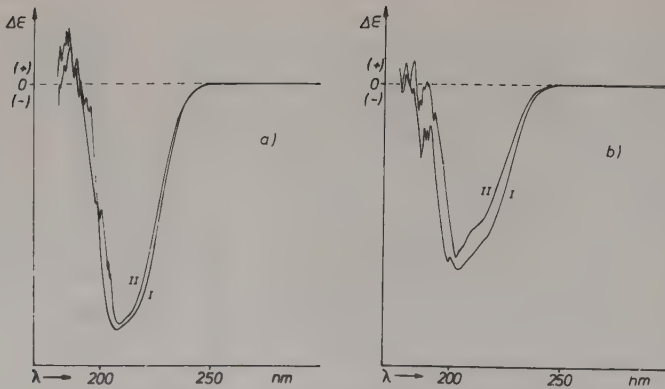


Abb. 22: CD-Spektren des BSA (I) und MBSA (II) in 1 % wäßriger NaCl-Lösung bei pH = 7 (a) und pH = 11 (b).

Die Beibehaltung des α -helicalen Anteils läßt die Möglichkeit der Bildung von mehrfachen interchenaren Verknüpfungen zwischen zwei monomeren MBSA-Einheiten recht unwahrscheinlich werden, da diese starke Deformationen der Tertiär- und Sekundärstruktur bewirken würden.

8. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Einführung von Disulfid- und Sulfid-Brücken in Poly-L-serin und Copolymeren aus L-Serin und Cbo-L-lysin bzw. L-Threonin und Cbo-L-lysin durch $\text{OH} \rightarrow \text{SH}$ -Umwandlung brachte für die einzelnen Produkte unterschiedliche Umsätze.

Die $\text{OH} \rightarrow \text{SH}$ -Umsätze lagen bei Polyserin unter 20 %, während für die Serin-Cbolysin-Copolymeren Umsätze zwischen 20 und 30 % erzielt wurden. Der Hauptgrund für diesen Unterschied wird in der verschiedenartigen Kompaktheit der β -Strukturen des Poly-L-serins und der Copolymeren gesehen. Die Umsätze betrugen etwa das Dreifache wie die in der Literatur (11, 12) beschriebenen OH/SH -Umsätze an Cellulose. Die Anteile an freiem SH waren recht klein. So betrugen die Molverhältnisse von freiem SH zum Gesamt-(Cystin + Cystein) nur etwa 5 - 10 %. Dies deutet auf Häufungen der Disulfid-Brücken in den Strukturen hin, da offenbar nur wenige freie SH-Gruppen nicht in der Lage waren, wegen zu großer Isolierheit, d. h. zu weiter Entfernung zueinander, oxidativ intra- wie interchenare Brücken zu bilden. IR-Spektren, Röntgen-Diagramme und Differentialcalorigramme gaben keine Hinweise dafür, daß durch die Vernetzungen evidente Um- oder Destrukturierungen der β -Grundgerüste eintreten. Sulfid-Brückenbildung wurde durch Auftreten von Lanthionin in Aminosäure-Chromatogrammen nachgewiesen. In Übereinstimmung zur Theorie nahm der Lanthionin-Anteil mit steigendem pH-Wert von 9 $\rightarrow$ 11 bei der Umesterungsreaktion zu, in etwa gleichem Maße fielen die Cystin-Werte ab. Die Gesamtvernetzungsgrade aus Disulfid- und Sulfid-Brücken betrugen beim vernetzten Polyserin und Copoly-Ser/Cbolys (7/3) etwa 0,1; das bedeutet im Mittel etwa 1 Brücke auf 10 Aminosäurereste. Beim Copoly-Ser/Cbolys (1/1) kamen im Mittel nur 1 Brücke auf 15 Aminosäurereste. Dieser geringere Wert ist auf den höheren Cbo-Lysin-Anteil zurückzuführen.

Die $\text{OH} \rightarrow \text{SH}$ -Umsätze beim Threonin-Cbo-Lysin-Copolymeren sind wesentlich kleiner, der relative SH-Anteil wesentlich größer als bei den Serin-Polypeptiden. Neben dem hier gebildeten β -Methyl-cystein (β -Mercapto- α -amino-buttersäure) und dessen Oxidationsprodukt, dem β, β' -Dimethyl-cystin sind durch Eliminierungs-Additions-Reaktionen auch Lanthionin-Derivate und andere Cystein/Cystin-Derivate wie das Homocystin möglich. Daß sich hier wie bei den Serin-Polypeptiden auch interchenare Vernetzungen gebildet haben, wird durch ihre Unlöslichkeit in DCE oder HFIPA angezeigt.

Der enzymatische Abbau der vernetzten Serin-Lysin-Copolymeren durch Trypsin läuft trotz der Wasserunlöslichkeit recht rasch ab. Die Abbaugeschwindigkeit ist aber offenbar in hohem Maße vom Vernetzungsgrad abhängig. Der geringe Anteil von abgebautem Lysin an den übrigen Abbauprodukten zeigt, daß das Lysin der Copolymeren nur zu einem geringen Teil in Blöcken vorliegt.

Die OH $\rightarrow$ SH -Umwandlung am Rinderserum-Albumin (BSA) brachte eine deutliche Erhöhung des Cystein/Cystin-Anteils. Gleichzeitig wurde der Serin-Anteil deutlich, der Threonin-Anteil geringfügiger gesenkt. Wegen des Abbaues anderer Aminosäuren - wie am auffälligsten Lysin und Tyrosin auf etwa ihren halben Wert - ist eine Serin/Cystein Umwandlungsrelation nicht quantitativ anzugeben. Sie dürfte aber etwas höher liegen als bei den Serin-Copolymeren. Eine Unsicherheit bringt auch das Threonin, da seine Umwandlungsprodukte wie das β, β' -Dimethyl-cystin vom Cystin und anderen Aminosäuren überlagert werden (siehe 4.2.). Der freie SH-Anteil war wesentlich höher als bei den umgeesterten Polymeren. Da dieser auch aus den Umwandlungsprodukten des Threonins und Tyrosins - wenn auch nur zu einem kleinen Teil - gebildet wird, ist eine genaue Cystein-Bestimmung nicht möglich. Das Verhältnis aus freien SH-Anteilen zum Gesamtanteil von Cystin + Cystein beträgt etwa 20 Mol-% im MBSA.

Neben intrachenaren werden offenbar auch interchenare Brücken gebildet. Dies führt in erster Linie zur Dimerisierung des MBSA; es entstehen aber auch Oligomere, die zum Teil wasserunlöslich sind. Dies geschieht insbesondere bei längerem Stehenlassen an der Luft. So ist wohl die oxidative Disulfid-Verknüpfung maßgeblich an der Brückenbildung beteiligt. Andere kovalente Brückenbildungen - wie die Lanthionin-Brücke - sind nicht auszuschließen. Bei dem relativ hohen freien SH-Anteil des MBSA ist die Bildung mehrerer interchenarer Brücken zwischen zwei Monomerketten möglich.

Die erhebliche chemische Modifizierung des Rinderserum-Albumins ist offenbar nicht von einem Abbau helicaler Anteile begleitet. Die CD-Spektren des BSA und des MBSA sind sehr ähnlich.

Ein Vergleich der OH $\rightarrow$ SH -Umsätze an den Serin-Polymeren mit den am Rinderserum-Albumin zeigt 1.) einen Wert etwa gleicher Größe, 2.) eine Cystein/Cystin-Relation, die beim MBSA deutlich größer ist. Dies deutet beim umgeesterten Polymeren auf eine weitgehende Cumulation, beim MBSA auf eine stärkere Isolation der gebildeten Cystein-Reste hin.

9. Experimenteller Teil

9.1. Darstellung der N-Carboxy-anhydride

a) O-Acetyl-L-serin (15,39):

Zu der bei 0°C hergestellten Acetyliermischung aus 20 g ($\approx 0,12$ Mol) ca. 60 %iger HClO_4 , 10,1 g Acetanhydrid und ca. 180 ml 100 %iger Essigsäure wurden unter Rühren bei 0°C 10 g (0,095 Mol) L-Serin und 48 g (0,47 Mol) Acetanhydrid gegeben. Danach wurde noch 2 h bei Zimmertemperatur geführt, dann 4 ml Wasser und 18,5 ml Amylamin zugegeben. Die klare Lösung wurde unter Rühren in ca. 1,2 l Äther gegeben, wobei das O-Acetyl-L-serin rein weiß und fein kristallin ausfiel - Nachfällung aus der Äther-Lösung bei -20°C. Dann wurde der Niederschlag abgesaugt und über NaOH i.Vac. mehrere Tage getrocknet.

Ausbeute: 12,5 g $\hat{=}$ 91 % d.Th. (Lit.: 91 %).

Zp.: 152 - 154 °C (Lit.: 143 - 144 °C für O-Ac-D,L-serin).

2. Ansatz: 15 g L-serin $\rightarrow$ 19,1 g O-Acetyl-L-serin $\hat{=}$ 92 % d.Th.

Zp.: 154 - 156 °C.

b) O-Acetyl-L-threonin (31,39):

Reaktionsführung wie bei der Darstellung des O-Acetyl-L-serins.

Ansatz: 11,3 g (0,095 Mol) L-Threonin; 48 g Acetanhydrid; 20 g HClO_4 (60%).

Fällung in ca. 1,5 l Äther; die Kristallisation war langsamer als beim O-Ac-L-serin - ca. eine Woche im Kühlschrank.

Ausbeute: ca. 80 % d.Th.

Zp.: 155 - 157 °C (Lit.: 158 - 159 °C).

c) N^ε-Carbobenzoxyl-L-lysin (40,41):

100 g (0,55 Mol) L-Lysin-monohydrochlorid wurden mit 150 g $\text{CuCO}_3\text{-Cu(OH)}_2$ in 100 ml Wasser 1 h gekocht. Das Reaktionsgemisch wurde heiß filtriert, das überschüssige basische Kupferkarbonat gut mit heißem Wasser gewaschen. Zum vereinigten Filtrat wurden unter intensivem Rühren 580 ml 2 n NaOH (1,16 Mol) und 102 g (0,6 Mol) Chlorameisensäure-benzylester bei 0°C tropfenweise zugegeben. Der ausgefallene Cu-Komplex wurde abgesaugt, mit Wasser und Aceton gewaschen und in ca. 1,2 l 2 n HCl suspendiert. Danach wurde bei 40°C bis zur vollständigen Fällung

H₂S eingeleitet und vom Niederschlag abgesaugt. Die Mutterlauge wurde bis zur Trockene eingeengt und die zurückgebliebene kristalline Masse in einem warmen Gemisch von 1 l Wasser und 300 ml Methanol aufgenommen. Während der Zugabe von NH₃-Lösung bis pH = 7 fiel das Produkt in feinen farblosen Blättchen aus. Über Nacht wurde stehengelassen, dann abfiltriert und mit warmem Wasser (30-40 °C) gewaschen. Mehrmals wurde aus Wasser/Methanol umkristallisiert, über NaOH i.Vac. getrocknet.

Ausbeute: 108 g $\hat{=}$ 70 % d.Th. (Lit.: 85 %).

Fp.: 235 - 240 °C (Lit.: 248 - 255 °C).

d) O-Acetyl-N-carboxy-L-serin-anhydrid (16):

Die N-Carboxy-Anhydride (Leuchs'sche Anhydride, NCA) wurden in der in Abb. 23 gezeigten Apparatur dargestellt. Zur Entfernung von Feuchtigkeit wurde die Apparatur mit trockenem Stickstoff gespült. Das temperierbare Reaktionsgefäß wurde unter Rühren bei 20 °C mit ca. 500 ml abs. THF und dann mit 30 g O-Acetyl-L-serin im N₂-Gegenstrom beschickt. In diese Suspension wurde bei 40 °C unter intensivem Rühren etwa 1/2 h Phosgen eingeleitet, wobei entstehender Chlorwasserstoff und überschüssiges Phosgen in nachgeschalteten Waschflaschen mit 20 %iger Kalikaugel vernichtet wurden. Die entstandene klare hellgelbe Lösung wurde durch eine Glasfritte in eine Vorlage abgesaugt, dann im Vakuum bei etwa 40 °C eingeengt. Der gelbe ölige Rückstand wurde in ca. 200 ml abs. THF aufgelöst und wieder eingeengt. Das Rohprodukt wurde in ca. 100 ml abs. THF gelöst und mit ca. 800 ml abs. n-Heptan im N₂-Gegenstrom gefällt. Der ölige Niederschlag kristallisierte in ca. 1 Woche bei -20 °C rein weiß aus. Er wurde in einer Schutzgasfritte abgesaugt, in THF / Heptan umkristallisiert und wieder bei -20 °C auskristallisiert.

Ausbeute: 28,2 g $\hat{=}$ 80 % d.Th. (Lit.: 78 %).

Fp.: 49 - 51 °C (Lit.: 50 - 51 °C).

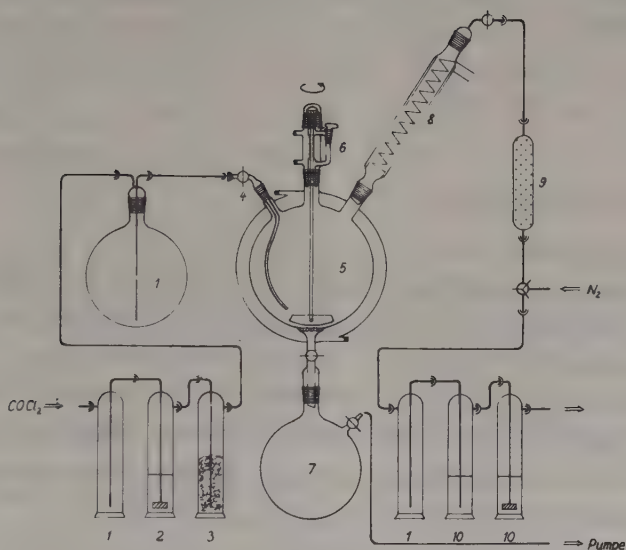


Abb. 23: Apparatur zur Darstellung der N-Carboxy-Anhydride (NCA).
 1. Sicherheitsgefäße, 2. Gaswaschflasche mit konz. H_2SO_4 ,
 3. Gaswaschflasche mit Glaswatte, 4. Gaseinleitungsrohr,
 5. Reaktionsgefäß mit Temperiermantel und eingeschmolzener Glasfritte D2, 6. KPG-Rührer, 7. Auffanggefäß, 8. Intensivkühler, 9. $CaCl_2$ -Rohr, 10. Gaswaschflaschen mit 20 %iger KOH.

e) O-Acetyl-N-carboxy-L-threonin-anhydrid (31):

9 g O-Acetyl-L-threonin wurden unter Rühren bei $20^{\circ}C$ unter N_2 -Gegenstrom in ca. 300 ml abs. THF im obigen Reaktionsgefäß suspendiert; dann wurde unter intensivem Rühren bei $45^{\circ}C$ Phosgen eingeleitet. Nach ca. 20 min ergab sich eine klare hellgelbe Lösung, die abgesaugt und bei $40^{\circ}C$ i. Vac. eingeeengt wurde. Der Rückstand wurde in ca. 100 ml abs. THF aufgenommen und wieder eingeeengt. Das hellgelbe ölige Rohprodukt wurde direkt zur Copolymerisation eingesetzt.

f) N^{ϵ} -Carbobenzoxy- N^{α} -carboxy-L-lysin-anhydrid (41):

In eine Suspension von 30 g N^{ϵ} -Carbobenzoxy-L-lysin in ca. 800 ml abs. THF in obigem Reaktionsgefäß wurde unter intensivem Rühren bei $40^{\circ}C$ etwa 1,5 h Phosgen eingeleitet. Die hellgelbe Lösung wurde abgesaugt und bei $40^{\circ}C$ i. Vac. eingeeengt.

Weiter wie bei d). Die reinen weißen Kristalle wurden bei -20°C in abs. THF/Heptan unter N_2 aufbewahrt.

Ausbeute: $29,6 \text{ g} \hat{=} 90 \% \text{ d.Th. (Lit.: } 85 \% \text{)}$.

Zp.: $98 - 100^{\circ}\text{C}$ (Lit.: $95 - 100^{\circ}\text{C}$).

9.2. Darstellung des Poly-L-serins

a) Poly-O-acetyl-L-serin (15) :

10 g O-Acetyl-L-serin-N-carboxyanhydrid wurden in ca. 100 ml abs. THF gelöst.

Zur Initiierung wurden einige Tropfen 0,2 n NaOH unter Rühren zugegeben. Das

Polymerisationsgemisch wurde 14 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen.

Der Reaktionskolben war dabei mit einem Trockenrohr verbunden, aber nicht ver-

schlossen. Nach einigen Tagen begann das gebildete Polymerisat auszufallen. Nach

14 Tagen wurde der Niederschlag abgesaugt, mehrmals mit Äther/Alkohol gewaschen

und i.Vac. getrocknet. Ausbeute: $7 \text{ g} \hat{=} 94 \% \text{ d.Th. ; Zp. } > 300^{\circ}\text{C}$

Elementaranalyse: C 44,6 % (46,5 % = theoret. Wert) ; H 5,5 % (5,4 %) ;

N 9,9 % (10,8 %).

b) Poly-L-serin (15) :

3,5 g Poly-O-acetyl-L-serin wurden in 25 %-igem NH_3 in 3 Tagen bei Zimmertempe-

ratur unter Rühren deacetyliert (IR). Überschüssiges NH_3 wurde abgezogen, das

Polymere mit Wasser und Alkohol/Äther gewaschen. Der wasserlösliche Teil ($\approx 10\%$)

des Polyserins wurde über Sephadex G 50 von Monomeren (Ammoniumacetat, Acet-
amid, Serin) abgetrennt.

Elementaranalyse: C 39,7 (41,1) ; H 5,8 (6,0) ; N 16,0 (15,0).

9.3. Darstellung des Copoly-N^ε-carboboxy-L-lysyl-L-serin (3/7) u. (1/1)

a) Copoly-N^ε-cbo-lysyl-O-acetyl-L-serin (3/7) :

7,5 g (0,044 Mol) O-Acetyl-L-serin-N-carboxyanhydrid und 6,5 g (0,022 Mol)

N^ε-Carboboxy-L-lysin-N^α-carboxyanhydrid wurden in ca. 300 ml abs. THF

gelöst. Die Lösung wurde unter Rühren mit 3 Tropfen Pentylamin initiiert. Das

Molverhältnis NCA/Initiator betrug hierbei etwa 180. Nach einer Woche stehenlassen bei Zimmertemperatur wurde das gelartig ausgefallene Copolymere abgesaugt, mehrmals mit Aceton/Methanol gewaschen und i. Vac. getrocknet. Das hellgelbe Copolymere hatte einen Zp. $> 270^{\circ}\text{C}$.

Ausbeute: 10 g $\hat{=}$ $\approx 90\%$ d.Th. (Ser/Lys = 2/1).

Elementaranalyse: C 51,0 % (57,4 %)¹⁾; H 6,0 % (6,1 %); N 10,6 % (10,8 %).

b) Copoly-N^ε-cbo-L-lysyl-L-serin (3/7):

5 g Copoly-N^ε-cbo-L-lysyl-O-acetyl-L-serin (3/7) wurden in 50 ml 25 %-iger NH₃ 1 Woche bei Zimmertemperatur gerührt, das Produkt abgesaugt, mehrmals mit Wasser und Alkohol/Äther gewaschen und über P₂O₅ i. Vac. getrocknet.

Ausbeute: 3,8 g $\hat{=}$ 95 % d.Th. (Ser/Lys = 7/3).

Aminosäureanalyse: Serin = 70 Mol-%, Lysin = 30 Mol-%.

c) Copoly-N^ε-cbo-L-lysyl-O-acetyl-L-serin (1/1):

7 g (0,038 Mol) O-Acetyl-L-serin-NCA und 12 g (0,040 Mol) N^ε-cbo-L-lysin-NCA wurden in ca. 500 ml abs. THF gelöst und zur Initiierung einige Tropfen Pentylamin (Mole NCA/Init. ≈ 150) unter Rühren zugesetzt. Weiter wurde wie unter a) verfahren.

Ausbeute: 13,8 g $\hat{=}$ $\approx 90\%$ d.Th. (Ser/Lys = 1/1); Zp.: 270°C

Elementaranalyse: C 57,3 % (58,5 %)²⁾; H 6,2 % (6,4 %); N 10,6 % (10,7 %).

d) Copoly-N^ε-cbo-L-lysyl-L-serin (1/1):

3,8 g Copoly-N^ε-cbo-L-lysyl-O-acetyl-L-serin (1/1) wurden in 50 ml 25 %-igem NH₃ 3 Tage bei Zimmertemperatur gerührt, das Produkt abgesaugt, mehrmals mit Wasser und Alkohol/Äther gewaschen und über P₂O₅ i. Vac. getrocknet.

Ausbeute: 3,0 g $\hat{=}$ 88 % d.Th. (Ser/Lys = 45/55).

Aminosäureanalyse: Serin = 45 Mol-%, Lysin = 55 Mol-%.

1) Theoretische Werte bezogen auf Ser/Lys = 7/3; 2) Ser/Lys = 45/55.

9.4. Darstellung des Copoly-N^ε-carboboxy-L-lysyl-L-threonin (1/1)

a) Copoly-N^ε-cbo-L-lysyl-O-acetyl-L-threonin (1/1):

Ca. 2 g (≈ 0,011 Mol) O-Acetyl-L-threonin-NCA (Öl) und 3 g N^ε-Cbo-L-lysin-NCA wurden in ca. 300 ml abs. THF gelöst und mit einigen Tropfen Pentylamin unter Rühren initiiert (Mol NCA/Init. ≈ 150). Nach 3 Wochen bei 35 - 45°C wurde das Copolymere mit Methanol/Wasser aus der klaren Lösung gefällt, abgesaugt, mehrmals mit Methanol/Wasser gewaschen und über P₂O₅ i. Vac. getrocknet.

Ausbeute: 2,7 g ≅ 70 % d.Th. (Thr/Lys = 1/1). Zp. > 250°C

Elementaranalyse: C 57,4 % (58,0 %)¹⁾; H 6,6 % (6,7 %); N 10,3 % (10,2 %).

b) Copoly-N^ε-cbo-L-lysyl-L-threonin (1/1):

1,5 g Copoly-N^ε-cbo-L-lysyl-O-acetyl-L-threonin wurden in 50 ml 2 n wässriger Natriummethylatlösung 4 Tage bei Zimmertemperatur gerührt, abgesaugt, mehrmals mit Wasser/Methanol gewaschen und über P₂O₅ i. Vac. getrocknet.

Ausbeute: 1,2 g ≅ 90 % d.Th. (Thr/Lys = 1/1).

Elementaranalyse: C 56,3 % (57,8 %)¹⁾; H 6,4 % (6,9 %); N 10,8 % (11,7 %).

Aminosäureanalyse: Threonin = 55 Mol-%, Lysin = 45 Mol-%.

9.5. OH → SH Umwandlung am Poly-L-serin

a) Tosylierung des Poly-L-serins:

In eine eisgekühlte Lösung von 5 g Tosylchlorid in 20 ml trockenem Pyridin wurden 2 g Poly-L-serin suspendiert. Nach 3 Tagen Rühren bei Zimmertemperatur - die Suspension hatte nach einiger Zeit eine braune Farbe angenommen - wurde das tosylierte Polymere abgesaugt und mit Wasser/Methanol gewaschen. Überschüssiges Tosylchlorid wurde anschließend durch mehrmaliges Waschen mit Äther entfernt. Das hellbraune Polymere hatte einen Schwefelgehalt von S = 8,61%, was eine 58 %-ige Tosylierung der Seryl-Reste bedeutet. Ein weiterer Ansatz hatte nur ein S = 6,03 % ≅ 45 %-ige Tosylierung.

b) S-Acetylierung des tosylierten Poly-L-serins (Umesterung):

0,5 g tosyliertes (58 %) Poly-L-serin wurden in wässriger 4 n Kaliumthioacetatlösung suspendiert und 3 Tage bei Zimmertemperatur gerührt. Die Thioacetat-Lösung wurde mit KOH auf pH = 9 gebracht. Während der Reaktion trat eine Aufhellung der

1) Theoretische Werte bezogen auf Thr/Lys = 55/45.

Suspension ein. Das umgeesterte Polymere wurde abgesaugt, mehrmals mit Wasser/Methanol gewaschen und über P_2O_5 i. Vac. getrocknet. $S = 8,61 \%$. Ebenso wurde die Umesterung bei $pH = 11$ durchgeführt.

9.6. OH $\rightarrow$ SH Umwandlung am Copoly-N⁶-cbo-L-lysyl-L-serin (3/7) u. (1/1)

a) Tosylierung des Copoly-Cbolys/Ser (3/7):

3 g Copoly-Cbolys/Ser (3/7) wurden unter Eiskühlung in einer Lösung von 5 g Tosylchlorid in 20 ml trockenem Pyridin suspendiert und 3 Tage bei Zimmertemperatur gerührt. Die hellbraune Suspension ging nach und nach in eine hochviskose dunkelbraune Lösung über, aus der mit Methanol/Wasser ein filtrierbarer Niederschlag gefällt wurde. Dieser wurde abgesaugt, mehrmals mit Methanol/Wasser und anschließend mehrmals mit Äther gewaschen. Das dunkelbraune und kristalline tosylierte Polymere hatte einen Schwefel-Gehalt von $S = 5,81 \%$, was einer 66 %-igen Tosylierung der Seryl-Reste entspricht.

b) S-Acetylierung des tosylierten Copoly-Cbolys/Ser (3/7):

0,4 g tosyliertes Copoly-Cbolys/Ser (3/7) wurden in wässriger 4 n Kaliumthioacetat-Lösung, die mit KOH auf $pH = 9$ gebracht war, 3 Tage bei Zimmertemperatur gerührt. Dabei trat eine Aufhellung der Suspension von dunkelbraun nach hellbraun ein. Das umgeesterte Copolymere wurde abgesaugt, mehrmals mit Wasser/Methanol gewaschen und über P_2O_5 i. Vac. getrocknet. $S = 8,85 \%$. Ebenso wurde die Umesterung bei $pH = 11$ durchgeführt.

c) Tosylierung des Copoly-Cbolys/Ser (1/1):

2,7 g Copoly-Cbolys/Ser (1/1) wurden unter Eiskühlung in einer Lösung von 3 g Tosylchlorid in 20 ml trockenem Pyridin suspendiert und 3 Tage bei Zimmertemperatur gerührt. Die hellbraune Suspension ging rasch in eine rotbraune bis dunkelbraune hochviskose Lösung über. Die viskose Lösung wurde dann in ca. 300 ml Äther gefällt. Der braune flockige Niederschlag wurde abgesaugt und mehrmals mit Äther/Methanol gewaschen. Das dunkelbraune tosylierte Copolymere hatte einen Schwefelgehalt von $S = 3,03 \%$, was einer 43 %-igen Tosylierung der Seryl-Reste entspricht.

d) S-Acetylierung des tosylierten Copoly-Cbolys/Ser (1/1):

0,5 g tosyliertes Copoly-Cbolys/Ser (1/1) wurden in wässriger 4 n Kaliumthioacetat-Lösung, die mit KOH auf $pH = 9$ gebracht war, 2 Tage bei Zimmertemperatur gerührt.

Dabei trat eine Aufhellung der Suspension von dunkelbraun nach hellbraun ein. Das umgeesterte Copolymere wurde abgesaugt, mehrmals mit Wasser/Methanol gewaschen und über P_2O_5 i.Vac. getrocknet. $S = 3,31 \%$. Ebenso wurde die Umesterung bei $pH = 11$ durchgeführt.

9.7. OH $\rightarrow$ SH Umwandlung am Copoly-N⁶-cbo-L-lysyl-(O-acetyl)-L-threonin (1/1)

a) Tosylierung des Copoly-Cbolys/(Ac)thr (1/1):

0,5 g partiell deacetyliertes Copoly-Cbolys/(Ac)thr (1/1) wurden unter Rühren in einer eingekühlten Lösung von 0,5 g Tosylchlorid in 10 ml trockenem Pyridin viskos gelöst. Die zuerst gelbe und nach einiger Zeit braun werdende viskose Lösung wurde 2 Tage bei Zimmertemperatur gerührt und dann in ca. 100 ml Äther gefällt. Der braune flockige Niederschlag wurde abgesaugt und mehrmals mit Äther/Methanol gewaschen. Das braune tosylierte Copolymere hatte einen Schwefelgehalt von $S = 2,03 \%$; das entspricht einer 58 %-igen Tosylierung der deacetylierten Threonyl-Reste bei einer Deacetylierung von 50 %.

b) S-Acetylierung des tosylierten Copoly-Cbolys/(Ac)thr (1/1):

0,1 g tosyliertes Copoly-Cbolys/(Ac)thr (1/1) wurde in wässriger 4 n Kaliumthioacetatlösung, die mit KOH auf $pH = 9$ gebracht worden war, 3 Tage bei Zimmertemperatur gerührt. Dabei trat eine Aufhellung der braunen Suspension ein. Das umgeesterte Copolymere wurde abgesaugt, mehrmals mit Wasser/Methanol gewaschen und über P_2O_5 i.Vac. getrocknet. $S = 2,31 \%$. Ebenso wurde die Umesterung bei $pH = 11$ durchgeführt.

9.8. OH $\rightarrow$ SH Umwandlung von Rinder-Serum-Albumin

a) Tosylierung des Serum-Albumins:

1 g Rinder-Serum-Albumin (MERCK) wurde in 150 ml Na-Phosphatpuffer (0,1 m; $pH = 9$) gelöst. Dazu wurde eine Lösung von 0,5 g Tosylchlorid in 50 ml Dioxan gegeben. Die klare, schwach gelbe Lösung wurde 3 Tage bei Zimmertemperatur gerührt. Dann wurde das Dioxan i.Vac. bei $40^\circ C$ abgezogen und die Lösung bis auf etwa 100 ml eingeeengt und mehrere Tage bei $+5^\circ C$ stehengelassen. Ein aus Toluolsulfonat gebildeter Niederschlag wurde abfiltriert und die Lösung direkt zur Umesterung eingesetzt.

b) S-Acetylierung des tosylierten Serum-Albumins:

50 ml obiger Tosyl-Albumin-Lösung wurden mit 2,3 g Kaliumthioacetat ($\approx 0,4$ n) versetzt und auf pH = 9 gebracht. Nach 3 Tagen Rühren bei Zimmertemperatur wurde die Lösung mit KOH auf pH = 12 gebracht und 1 h gerührt. Danach wurde filtriert, die Lösung etwas eingeeengt und auf pH = 7 gebracht, das modifizierte Albumin über Sephadex G 200 abgetrennt und gefriergetrocknet.

9.9. Durchführung des enzymatischen Abbaues

a) Entfernung der Carbobenzoxy-Gruppen (34):

Vernetztes Copoly-N^ε-cbo-L-lysyl-L-serin (1/1) und (3/7) wurde jeweils mit 6 n HCl in 50 %-igem Äthanol bei Zimmertemperatur ca. 20 h gerührt. Die unlöslichen Produkte wurden abgesaugt, mehrmals mit Äthanol gewaschen und i. Vac. über NaOH getrocknet.

b) Hydrolyse mit Trypsin:

Je 5 mg vernetztes Copoly-L-lysyl-L-serin (1/1) und (3/7) wurden jeweils in eine Lösung von 10 mg Trypsin (SERVA; lyophil., reinst, 180 EU/mg) in 4 ml Tris-Puffer pH 8,1 (42), der ca. 0,13 % Ca^{2+} hat, gegeben und bei 20°C im verschlossenen Reagenzglas langsam gerührt. Jeweils 2 ml-Proben wurden nach 4 und 20 h entnommen, eingeeengt, mit jeweils 2 ml 0,2 n Natriumcitrat-Puffer pH 2,2 versetzt, filtriert und auf den Aminosäureanalysator gegeben.

9.10. Bestimmung der freien SH-Gruppen nach ELLMAN (24)

2 - 10 mg trockenes Polymeres bzw. trockenes BSA oder MBSA wurden jeweils in 1 ml 15 %-iger H_2SO_4 unter Rühren 1 - 2 h bei 100°C hydrolysiert. Zu diesem Hydrolysat wurden 10 ml 1 m Trispuffer von pH 7,4, 1 ml DTN-Lösung in 0,1 m Trispuffer von pH 4,0 und 2 ml 3 m Trislösung gegeben. Durch Reaktion der SH-Gruppen mit DTN entsteht das Anion des 3-Carboxy-4-nitro-thiophenols. Es ist ein gelber Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 412 m μ . Da der entstehende Farbstoff lichtempfindlich ist, muß unter Ausschluß von Tageslicht gearbeitet werden. Die Extinktion der filtrierten Lösung wurde mit einem ZEISS-Photometer des Typs Elko II unter Verwendung der Filter S 42 E oder Hg 405 68 ermittelt und daraus die Konzentration an freien SH-Gruppen berechnet:

$$\mu \text{ Mole-SH/g} = \frac{\epsilon \cdot 14 \cdot 1000}{13600 \cdot \text{Einwaage (g)}} = \epsilon \cdot \frac{1,03}{\text{Einwaage (g)}}$$

wobei ϵ = gemessene Extinktion (1 cm-Küvette) und der Wert 13 600 die molare Extinktion des Farbstoffs für $\lambda = 412 \text{ m}\mu$ ist.

Für die Bestimmung des Cysteins ergibt sich:

$$\begin{aligned} \text{Gew.-% Cystein} &= 1 \mu \text{ Mol Cystein} \cdot \mu \text{ Mole-SH/g} \cdot 100 \% \\ &= \mu \text{ Mole-SH/g} \cdot 0,0121 \end{aligned}$$

In der Vergleichsmeßlösung wurde das Hydrolysat durch 1 ml 15 %-iger H_2SO_4 ersetzt.

9.11. Durchführung der Aminosäure-Analysen (7)

Alle Analysen wurden mit einem Gerät der Fa. BIOCAL (München) BC 201 mit dem Probenaufgeber 500 durchgeführt.

a) Verfahren:

Für die gleichzeitige Bestimmung der sauren, neutralen und basischen Aminosäuren wurde das Hydrolysat-Einsäulen-Verfahren an einer Säule mit dem Harz Bio Rad A 6 angewendet. Die Füllhöhe betrug 60 cm, die Pufferdurchflußgeschwindigkeit 100 ml/h, die Ninhydrindurchflußgeschwindigkeit 50 ml/h.

Die Apparatur wurde folgendermaßen programmiert:

Zeit:	Puffer:	Temperatur:	Ninhydrin
53 min	0,2 n pH 3,25	55°C	"
85 min	0,2 n pH 4,25	"	"
160 min	0,8 n pH 6,45	"	"
185 min	0,4 n NaOH	"	"
190 min	0,2 n pH 3,25	"	"
220 min	0,2 n pH 3,25	"	—

Mit diesem Verfahren lassen sich Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, Lys, His, NH_3 und Arg in dieser Reihenfolge gut bestimmen.

Die quantitativen Bestimmungen wurden mittels programmiertem Rechner oder auch in Zweifelsfällen mittels 50 n Mol-Test in Handauswertung durchgeführt (Höhe x Halbwertsbreite).

b) Herstellung der Hydrolysenproben:

Ca. 5 - 10 mg trockenes Polymeres bzw. 10 - 20 mg trockenes BSA oder MBSA wurden in einem Reagenzglas mit 10 ml 6 n HCl versetzt und in einer Eis-Kochsalz-Mischung abgekühlt. Die Probe wurde daraufhin gut mit Stickstoff durchgespült und abgeschmolzen. Anschließend wurde sie 12 h bei 105°C unter mehrmaligem Schütteln hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde danach am Rotavapor zur Trockne eingedampft, ein- bis zweimal mit dest. Wasser aufgenommen und erneut eingedampft, um die Salzsäure vollständig zu entfernen. Der Rückstand wurde mit 0,2 n Natriumcitratpuffer pH 2,2 zu 10 - 50 ml aufgefüllt und nach Filtrieren zur Analyse am Aminosäureanalyator eingesetzt. Es wurde je 1 ml in den Probenaufgeber gegeben.

9.12. Durchführung der gelchromatographischen Trennungen

a) Trennung des wasserlöslichen Polyserins an Sephadex G-50:

Die präparative Abtrennung des wasserlöslichen Teils des Poly-L-serins von monomerem Serin, Ammoniumacetat und Acetamid wurde mit einer Sephadex G-50 -Säule durchgeführt.

Bedingungen: Säule 2,5 x 100 cm; Puffer 0,15 g Na_2HPO_4 / l, pH = 7,0;
flow rate = 25 ml/h.

Detektoren: 1. Differential-Refraktometer Waters R 401
2. LKB Conductolyzer.

b) Trennung des dimeren und oligomeren MBSA von monomerem MBSA bzw. BSA und niedermolekularem:

Die Abtrennung wurde an Sephadex G-200 bzw. LKB-Ultrogel AcA 34 (Fraktionierungsbereich für globuläre Proteine: $2 \cdot 10^4 - 4 \cdot 10^5$) durchgeführt.

Bedingungen für beide Gele: Säule 2,5 x 100 cm; Puffer 0,15 g Na_2HPO_4 / l,
pH = 7,0; flow rate = 15 ml/h.

Detektoren: Differential-Refraktometer Waters R 401
LKB Uvicord II.

9.13. Durchführung der Molekulargewichtsbestimmungen

9.13.1. Endgruppen-Verfahren nach SANGER (19)

Die Molekulargewichtsbestimmung nach SANGER beruht auf einem photometrischen Vergleich der Extinktionen des an der freien Aminogruppe mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol umgesetzten Polymeren mit dem entsprechend behandelten Monomeren. Nach diesem Verfahren wurde das Molekulargewichtsmittel des dargestellten Poly-O-acetyl-L-serin ermittelt. Dazu wurde hier das N-(2,4-Dinitro-phenyl)-poly-O-acetyl-L-serin (Poly-O-acserin-DNB) und das N-(2,4-Dinitro-phenyl)-O-acetyl-serin (O-Acserin-DNB) dargestellt. Diese sind gelbe Farbstoffe.

a) Darstellung des N-(2,4-Dinitro-phenyl)-O-acetyl-L-serin :

In einem Rundkolben mit Rückflußkühler werden 93 g O-Acetyl-L-serin in 7,5 ml 96 %-igem Äthanol gelöst. Dazu wird eine Lösung von 0,8 g 2,4-Dinitro-fluorbenzol in 10 ml 96 %-igem Äthanol gegeben. Die sich rasch gelb färbende Lösung wird ca. 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Der überschüssige Alkohol wird abgezogen und nicht umgesetztes DNFB durch mehrmaliges Digerieren mit Äther entfernt. Bei Zugabe von verd. HCl scheidet sich ein gelbes Öl ab. Dieses wird in Methanol aufgenommen und anschließend mit Wasser gefällt. Das O-Acserin-DNB kristallisiert in der Kälte in gelben Nadeln aus.

b) Darstellung des N-(2,4-Dinitro-phenyl)-poly-O-acetyl-L-serin :

Einwaagen und Reaktionsführung und Aufarbeitung bis zum Digerieren mit Äther wie beim Monomeren. Man erhält hier allerdings keine klare gelbe Lösung sondern eine hellgelbe Suspension. Das umgesetzte Polymere wird mit Aceton extrahiert und so von nicht umgesetztem Polymeren getrennt. Die gelbe Lösung wurde eingengt, der Rückstand in Methanol aufgenommen und mit Wasser gefällt. Das Poly-O-acserin-DNB kristallisiert in der Kälte aus.

Das Molekulargewicht des Polymeren wird aus der Extinktionsgleichung bestimmt:

$$E_{\text{Poly}} = \epsilon_0 \cdot c \cdot d \quad (\text{g/l} \times \text{cm}) ,$$

wobei E_{Poly} hier die Extinktion der Polymerlösung im Absorptionsmaximum ist.

Der molare Extinktionskoeffizient ϵ_0 ergibt sich aus einer Eichmessung der Monomerlösung:

$$\epsilon_0 = \frac{E_{\text{Mono}}}{c \cdot d} / \frac{1}{\text{Mol cm}}$$

Die Extinktionen der Absorptionsmaxima im sichtbaren Licht wurden mit dem Spektralphotometer DMR 21 der Firma ZEISS gemessen. Die Absorptionsmaxima der gelben Polymer- und Monomerlösung differierten um etwa 10 nm (Abb. 24).

Meßlösungen: 2 - 5 mg / 100 ml CHCl_3 ; als Vergleichslösung diente das Lösungsmittel.

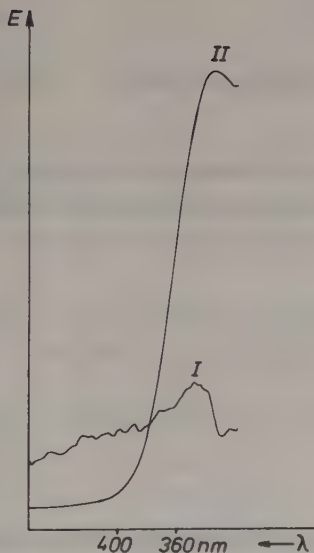


Abb. 24: Absorptionsspektrum des Poly-O-acserin-DNB (I) und des O-Acserin-DNB (II).

$$\lambda_{\max}^{(I)} = 345 \text{ nm};$$

$$\lambda_{\max}^{(II)} = 335 \text{ nm}.$$

Für die Eichmessung ergab sich bei einer Meßkonzentration $c = 0,05 \text{ g/l}$ des Monomeren:

$$E_{\text{Mono}} = \epsilon_0 \cdot 0,05 \text{ g/l} \cdot 1 \text{ cm} = 0,835 \rightarrow \epsilon_0 = 5,22 \cdot 10^3 \frac{1}{\text{Mol cm}}$$

Für das Polymere ergab sich bei $c = 0,02 \text{ g/l}$:

$$E_{\text{Poly}} = 0,015; \quad E_{\text{Poly}} = 5,22 \cdot 10^3 \cdot 0,02 \text{ g/Mol} \rightarrow$$

$$1 \text{ Mol} = \frac{5,22 \cdot 20}{0,015} \text{ g} = 6960 \text{ g}; \quad \text{dies ist das Zahlenmittel } \bar{M}_n$$

des Poly-O-acserin-DNB.

Für das Zahlenmittel des Poly-O-acserin folgt dann: $\bar{M}_n = 6810$ und ein mittlerer Polymerisationsgrad $\bar{P}_n = 52$. Für eine zweite Probe ergaben sich: $\bar{M}_n = 7010$; $\bar{P}_n = 54$.

9.13.2. Molekulargewichtsbestimmung mittels Dampfdruck-Osmometer (20)

Bestimmt wurden nach diesem Verfahren die Molekulargewichte von Copoly-N^ε-cbo-L-lysyl-O-acetyl-L-serin (3/7) und Copoly-N^ε-cbo-L-lysyl-O-acetyl-L-threonin (1/1).

Das Zahlenmittel des Molekulargewichtes $\bar{M}_n$ des Polymeren ergibt sich aus

$$\left(\frac{\Delta T}{C} \right)_{C \rightarrow 0} = K_E \frac{1}{\bar{M}_n}$$

ΔT = Dampfdruckdifferenz zwischen Lösungsmittel und Lösung,

C = Konzentration des Gelösten.

$\left(\frac{\Delta T}{C} \right)_{C \rightarrow 0}$ wird aus den gemessenen Werten durch graphische Extrapolation für $C = 0$ als $K_{\text{Meß}}^p$ bestimmt. K_E wird aus einer analogen Eichmessung mit bekanntem $\bar{M}_E$ bestimmt:

$$\left(\frac{\Delta T}{C_E} \right)_{C \rightarrow 0} = K_E \frac{1}{\bar{M}_E} = K_{\text{Meß}}^E ;$$

daraus ergibt sich für $\bar{M}_n$:

$$\bar{M}_n = \bar{M}_E \cdot \frac{K_{\text{Meß}}^E}{K_{\text{Meß}}^p}$$

Die zwischen dem Lösungs- und dem Lösungsmittel-Thermistor herrschende Temperaturdifferenz ΔT wird als Meßausschlag in Skt registriert: $\Delta T \sim \text{Meßausschlag (Skt)}$.

Als Lösungsmittel für das Serin-Copolymere diente HFIPA, für das Threonin-Copolymere DMF. Die Eichsubstanz war in beiden Fällen Benzil ($\bar{M}_E = 210, 23$).

Für das HFIPA wurde mit folgenden Konzentrationen gemessen:

C : 3, 4, 5, 6 g/l; C_E : 3, 4, 5, 6 g/l.

Die Temperatur der Meßzelle betrug hier 45°C.

Graphisch extrapoliert wurden $K_{\text{Meß}}^E = 6,2$ und $K_{\text{Meß}}^p = 0,21$ (Abb. 25). Daraus

ergibt sich für das Copoly-Cbols/Acser (3/7) ein Molekulargewichtsmittel von $\bar{M}_n = 210,23 \cdot \frac{6,2}{0,21} = 6200$ und ein mittlerer Polymerisationsgrad von $P_n = \frac{6200}{172} = 36$ (172 = mittleres Molekulargewicht des Monomeren für Ser/Lys = 7/3).

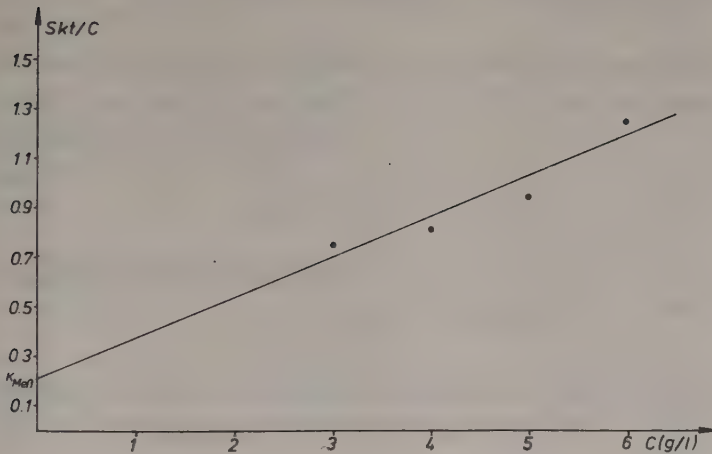


Abb. 25: Graphische Bestimmung von $K_{\text{Meß}}$ des Copoly-Cbolys/Acser (3/7) aus den dampfdruckosmometrischen Skt-Werten.

Für DMF wurde mit folgenden Konzentrationen gemessen:

C : 3,2; 4,3; 5,4; 6,5 g/kg *)

C_E : 3,2; 4,2; 5,25; 6,35 g/kg *)

Die Temperatur der Meßzelle betrug 90°C .

$K_{\text{Meß}}^E = 137$; $K_{\text{Meß}}^P = 3,5$ (Abb. 26).

Es ergibt sich für das Copoly-Cbolys/Acthr ein Molekulargewichtsmittel von

$\bar{M}_n = 210,23 \cdot \frac{137}{3,5} = 8300$ und ein mittlerer Polymerisationsgrad von

$\bar{P}_n = \frac{8300}{198} = 42$ (198 = mittleres Molekulargewicht der Monomeren für Thr/Lys = 1/1).

*) Die Konzentrationen in g/kg sind genauer als die in g/l.

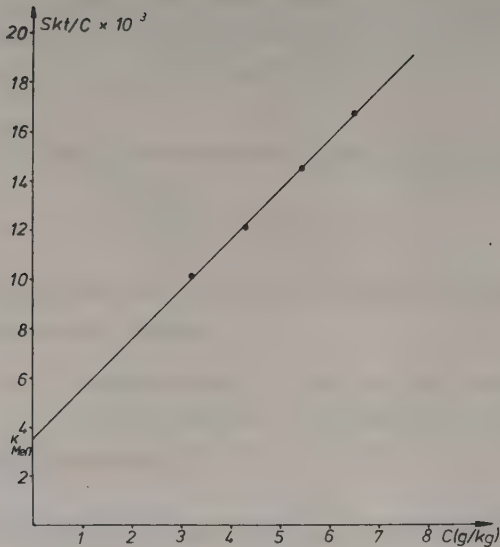


Abb. 26: Graphische Bestimmung von $K_{\text{Meß}}$ des Copoly-Cbolys/Acthr (1/1) aus den dampfdruckosmometrischen Skt-Werten.

9.13.3. Molekulargewichtsbestimmungen mittels analytischer Ultrazentrifuge (20,42)

Das Molekulargewicht des modifizierten Rinderserum-Albumins (MBSA) wurde mittels analytischer Ultrazentrifuge bestimmt und mit dem des Rinderserum-Albumins (BSA) verglichen.

a) Sedimentationskoeffizient-Bestimmung:

Das Molekulargewicht ergibt sich aus der Svedberg-Beziehung

$$M = \frac{RT}{(1 - V_2 \cdot \rho_1) D} \cdot \frac{dr/dt}{\omega^2 r}$$

für die Sedimentation im Feld der Ultrazentrifuge, wobei V_2 das partielle spezifische Volumen des sedimentierenden Stoffes (hier das Protein), ρ_1 die Dichte des Lösungsmittels, D der Diffusionskoeffizient, ω die Winkelgeschwindigkeit des Rotors und r der Abstand vom Rotormittelpunkt ist. Bestimmt wurde der Sedimentationskoeffizient s , definiert als $s = \frac{dr/dt}{\omega^2 r} [10^{-13} \text{ sec} = 1 \text{ S}]$, der hier als scheinbarer Wert S_{app}

ermittelt wird, da er von Druck, Temperatur und Eigenschaften der Lösung abhängig ist.

Gemessen wurde mit der analytischen Ultrazentrifuge der Firma BECKMAN mit $48 \cdot 10^3$ bzw. $60 \cdot 10^3$ UpM bei 20°C oder $21,5^\circ\text{C}$. Das Lösungsmittel war in allen Fällen 1 %-ige NaCl-Lösung.

Es gilt:

$$S_{\text{app}} = \frac{1}{\omega^2 r} \cdot \frac{dr}{dt}$$

oder zur graphischen Auswertung:

$$S_{\text{app}} = \frac{2,303}{\omega^2} \cdot \frac{d \log r_i}{dt}$$

Die Sedimentation wird durch die Schlieren-Methode als wandernder Peak sichtbar gemacht und in bestimmten Zeitintervallen fotografiert.

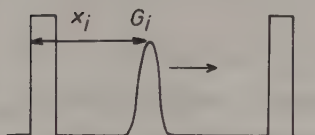


Abb.27: "Schlieren-Peak" (G_i) in UZ-Zelle schematisch; x_i = Abstand vom Zellenrand (innen).

Der Abstand x_i des Peaks G_i (Abb.27) vom Zellenrand (innen) wird jeweils unter Berücksichtigung des Filmvergrößerungsfaktors bestimmt. Durch Addition des Abstandes Zellenrand - Rotormitte (hier 5,7 cm) ergibt sich das jeweilige r_i . Durch Auftragen von $\log r_i$ gegen t ergibt sich eine Gerade, deren Steigung die zu bestimmende Größe $d \log r_i / dt$ darstellt. Δt betrug in allen Fällen 2 min.

S_{app} (BSA): UpM = $48 \cdot 10^3$; $T = 20^\circ\text{C}$; Lösungsmittel: 1 % NaCl;
Konzentration: 0,8 g/l.

t (min):	2	4	6	8	10
log r _i :	0,8075	0,8083	0,8088	0,8092	0,8098

t (min):	12	14	16	18	20
log r _i :	0,8103	0,8109	0,8116	0,8121	0,8128

$$2,303 / \omega^2 = 9,115 \cdot 10^{-8} \text{ sec}^2; \quad d \log r_i / dt = 4,83 \cdot 10^{-6} \text{ sec (graphisch)}$$

$$S_{\text{app}} (\text{BSA}) = 4,4 \cdot 10^{-13} \text{ sec (4,4 S)}.$$

MBSA: UpM = $48 \cdot 10^3$; T = 20°C; Lösungsmittel: 1 %-ige NaCl-Lösung;
Konzentration: ca. 0,5 g/l.

t (min):	2	4	6	8	10
log r _i :	0,8124	0,8135	0,8150	0,8160	0,8172

t (min):	12	14	16	18	20
log r _i :	0,8195	0,8208	0,8218	0,8226	0,8238

$$2,303 / \omega^2 = 9,115 \cdot 10^{-8} \text{ sec}^2; \quad d \log r_i / dt = 1,09 \cdot 10^{-5} \text{ sec}^{-1} \text{ (graphisch)}$$

$$S_{\text{app}} (\text{MBSA}) = 9,9 \cdot 10^{-13} \text{ sec (9,9 S)}.$$

Gemeinsamer S-Lauf von BSA und MBSA:

UpM = $60 \cdot 10^4$; T = 21,5°C; Lösungsmittel: 1 %-ige NaCl-Lösung;

BSA-Konzentration: ca. 0,6 g/l; MBSA-Konzentration: ca. 0,3 g/l.

BSA		MBSA	
t (min)	log r _i	t (min)	log r _i ¹⁾
2	0,7917	2	0,7986
4	0,7925	4	0,8000
6	0,7935	6	0,8022
8	0,7943	8	0,8040
10	0,7950	10	0,8056
12	0,7958	12	—
14	0,7965	14	—
16	0,7973	16	—
18	0,7983	18	—
20	0,7990	20	—

1) log r_i für t > 10 min nicht mehr genau bestimmbar.

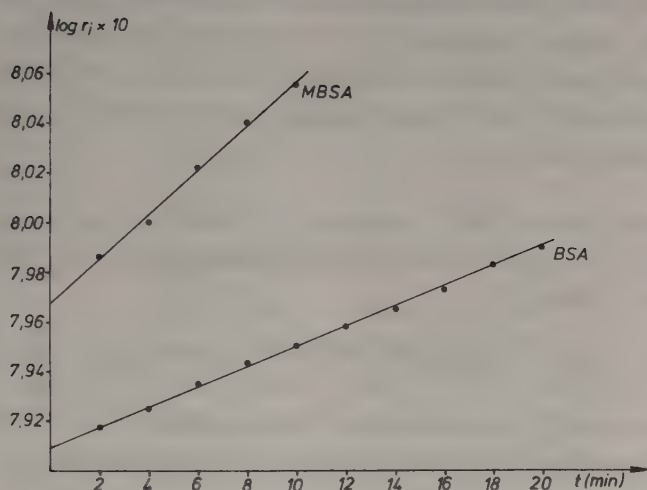


Abb. 28: Graphische Bestimmung von $d \log r_i / dt$ für BSA und MBSA;
 $UpM = 60 \cdot 10^4$; $T = 21,5^\circ C$.

MBSA: $2,303/\omega^2 = 5,834 \cdot 10^{-8} \text{ sec}^2$; $d \log r_i / dt = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$;
 $S_{app} = 8,75 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$.

BSA: $2,303/\omega^2 = 5,834 \cdot 10^{-8} \text{ sec}^2$; $d \log r_i / dt = 6,83 \cdot 10^{-6} \text{ sec}^{-1}$;
 $S_{app} = 4,0 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$.

b) Molekulargewicht aus Gleichgewichtslauf:

Das Molekulargewicht aus dem Sedimentationsgleichgewicht im Konzentrationsgradienten dc/dr ergibt sich nach:

$$M = \frac{RT}{(1 - V_2 \cdot \rho_1) \omega^2} \cdot \frac{dc/dr}{r \cdot c}$$

Für die Auswertung optischer Messungen nach dem Schlierenverfahren wurde hier die Beziehung

$$M_{app} = \frac{2 \cdot R \cdot T}{(1 - V_2 \cdot \rho_1)} \cdot \frac{2,303}{\omega^2} \cdot \frac{d \log o. D.}{dr^2}$$

verwendet, die den Gradienten der optischen Dichte enthält. Nachdem die o. D.-Werte (y_i -Werte in cm) und die dazugehörigen x_i - bzw. r_i -Werte (in cm; analog der S-Bestimmung) aus der Gleichgewichtskurve ermittelt sind, wird die Kurve $\log y = f(r^2)$ aufgetragen, die für molekularereinheitliche Substanzen eine Gerade ist. Ihre Steigung ist dann die für die Berechnung des scheinbaren Molekulargewichts M_{app} benötigte Größe $d \log y / d r^2$.

Für das Rinderserum-Albumin (BSA) - gemessen in 1 %-iger NaCl-Lösung bei 24 000 UpM und $T = 20^\circ\text{C}$ - ergab sich unter Berücksichtigung des partiellen spezifischen Volumens $V_2 = 0,734$ (8):

$$M_{app}(\text{BSA}) = \frac{2 \cdot 8,313 \cdot 10^7 \cdot 293 \cdot 2,303}{0,2814 \cdot 6,316 \cdot 10^6} \cdot 0,947 = 59\,800$$

Für die Berechnung von M_{app} des modifizierten Albumins (MBSA) wurde der gleiche Wert des partiellen spezifischen Volumens V_2 eingesetzt. Damit ergab sich für

$$M_{app}(\text{MBSA}) = \frac{2 \cdot 8,313 \cdot 10^7 \cdot 333 \cdot 2,303}{0,2814 \cdot 6,316 \cdot 10^6} \cdot 1,702 = 122\,110$$

für MBSA in 1 %-iger NaCl-Lösung bei 24 000 UpM und $T = 60^\circ\text{C}$.

9.14. Röntgen-Analysen

Die Röntgen-Analysen sind hier in allen Fällen Pulver-Diagramme, die entweder als Film oder mit dem Goniometer aufgenommen wurden. Die Film-Diagramme wurden mit einer Kiessig-Kamera (Flachfilmkamera) aufgenommen. Strahlung: CuK_α ($\lambda = 1,542 \text{ \AA}$); Graphit-Monochromator. Das PHILIPS-Röntgen-Goniometer selektiert mit Ni-Filter und Impulshöhen-Diskriminator CuK_α -Strahlung.

Die Gitterabstände d der untersuchten Polymeren ergeben sich nach der Bragg-Beziehung $d = \frac{\lambda}{2 \sin \theta}$. Der Glanzwinkel θ wird im Goniometer-Diagramm direkt aufgezeichnet, beim Film-Diagramm aus der Beziehung

$$\text{tg } 2\theta = \frac{\text{Radius der Reflexe}}{\text{Abstand Präparat - Film (x)}}$$

ermittelt.

Für das Poly-L-serin ergaben sich folgende Werte:

$x = 3,92$ cm; Pulver-Schichtdicke = 0,8 mm für Film; 1,5 mm für Goniometer.

Film:				Goniometer:	
Reflex-Nr.	$\lg 2 \theta$	$\theta (^\circ)$	$d (\text{\AA})$	$\theta (^\circ)$	$d (\text{\AA})$
1	0,25	7,0	6,4	6,5	6,8
2	0,30	8,4	5,5	8,2	5,4
3	0,37	10,1	4,5	9,8	4,5
4	0,40	10,9	4,1	10,6	4,2
5	0,46	12,4	3,6	11,6	3,8
6	0,49	13,0	3,4	12,5	3,6
7	0,61	15,7	2,9	15,3	2,9
8	0,68	17,1	2,6	16,5	2,7

Im Film-Diagramm wurden die Reflexe 2, 6 und 8 durch sehr schwache Mayler-Folien Reflexe überlagert. Nr. 3 ist der Hauptreflex.

Copoly-Cholys/Ser (3/7): $x = 4,0$ cm; Schichtdicken wie beim Poly-L-serin.

Film:				Goniometer:	
Reflex-Nr.	$\lg 2 \theta$	$\theta (^\circ)$	$d (\text{\AA})$	$\theta (^\circ)$	$d (\text{\AA})$
1	0,16	4,5	9,8	—	— ¹⁾
2	0,29	8,1	5,5	8,4	5,3
3	0,32	8,9	5,0		
4	0,34	9,4	4,7	9,4	4,7
5	0,38	10,4	4,3	10,3	4,3
6	0,46	12,4	3,6	12,2	3,6
7	0,48	12,8	3,5	12,7	3,5
8	0,57	14,9	3,0	14,2	3,1
9	0,58	15,0	3,0	14,8	3,0
10	0,89	20,8	2,2	—	— ¹⁾
11	0,93	21,4	2,1	—	— ¹⁾

Nr. 4 ist der Hauptreflex; ¹⁾ Reflexe nicht im aufgenommenen Bereich.

Copoly-Cbolys/Ser (1/1):				Copoly-Cbolys/Thr (1/1):		
Filme: $x = 5,0$ cm; Schichtdicke = $0,8$ mm						
Reflex-Nr.	tg 2θ	θ (°)	d (Å)	tg 2θ	θ (°)	d (Å)
1	0,10	2,9	15,2	0,10	2,9	15,2
2	0,19	5,4	8,2	0,19	5,4	8,2
3	0,29	8,1	5,5	0,29	8,1	5,5
4	0,32	8,9	5,0	0,32	8,9	5,0
5	0,35	9,6	4,6	0,34	9,4	4,6
6	0,43	11,6	3,8	0,44	11,9	3,7
7	0,47	12,6	3,5	0,47	12,6	3,5
8	0,65	16,5	2,7	0,64	16,3	2,7

Nr. 5 ist der Hauptreflex.

9.15. IR-, CD- und DTA-Analysen

Die IR-Spektren wurden aufgenommen mit dem Perkin-Elmer Gitter-IR-Spektral-photometer 457. Die Proben waren pulverisiert und als KBr-Tabletten gepreßt; 2 - 3 mg Polymere / 200 mg KBr.

Die CD-Spektren wurden gefahren mit dem Jasco J-20 Automatic Recording Spectro-Polarimeter. Schreiber-Aufzeichnung: 10 nm/cm.

BSA- und MBSA-Konzentrationen: 0,05 % in 1 %-iger NaCl-Lösung.

Die DTA-Analysen wurden gefahren mit dem Perkin-Elmer Differential Scanning Calorimeter DSC-1 B. Aufheizung: $8^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Proben: Copoly-Cbolys/Ser (3/7, unvernetzt) 11,4 mg ;

" " " (3/7, vernetzt) 10,3 mg.

10. Literaturverzeichnis

- 1) H.J.HORN, D.B.JONES und S.J.RINGEL, J. Biol. Chem. 138, 141 (1941).
- 2) E.GROSS, H.H.KILTZ und L.C.CRAIG, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 799 (1973).
- 3) F.W.PUTNAM, Science 163, 633 (1969).
- 4) H.FASOLD, Die Struktur der Proteine, S. 73, 268 (1972).
- 5) L.PAULING, The Nature of the Chemical Bond, S.83 (1960).
- 6) P.C.JOCELYN, Biochemistry of the SH Group, S.55 (1972).
- 7) Ch.EBERT, Dissertation, Marburg 1971.
- 8) H.R.MAHLER und E.H.CORDES, Biological Chemistry, S. 87, 116 (1971).
- 9) I.PHOTAKI, J. Am. Chem. Soc. 85, 1123 (1963).
- 10) I.PHOTAKI und V.BARDAKOS, J. Am. Chem. Soc. 87, 3489 (1965).
- 11) M.SAKAMOTO, Y.YAMADA und H.TOMANI, J. appl. Polymer Sci. 13, 1845 (1969).
- 12) R.F.SCHWENKER Jr., L.LIFLAND und E.PASCU, Text. Res. J. 32, 797 (1962).
- R.F.SCHWENKER Jr. und L.LIFLAND, Text. Res. J. 33, 107 (1963).
- 13) L.POLGAR und M.L.BENDER, J. Am. Chem. Soc. 88, 3153 (1966).
- , Biochemistry 6, 610 (1967).
- K.E.NEET und D.E.KOSHLAND Jr., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 56, 1606 (1966).
- 14) D.H.STRUMEYER, W.N.WHITE und D.E.KOSHLAND Jr., Proc. Natl. Sci. U.S. 50, 931 (1963).
- H.WEINER, W.N.WHITE und D.E.KOSHLAND Jr., J.Am.Chem.Soc. 88, 3851 (1966).
- 15) H.FRANKEL, S.CORDOVA und M.BREUER, J. Chem. Soc. 1953, 1991.
- 16) G.D.FASMAN und E.R.BLOUT, J. Am. Chem. Soc. 82, 2262 (1960).
- 17) F.FUCHS, Ber. 55, 2943 (1922).
- A.C.FARTHING, J. Chem. Soc. 1950, 3213.
- 18) S.L.BAILY, J. Chem. Soc. 1950, 3461.
- D.G.H.BALLARD und C.H.BAMFORD, Proc. Roy. Soc. A223, 495 (1954).
- 19) F.SANGER, J. Biochem. 49, 463 (1951).
- , J. Biochem. 60, 541 (1955).
- 20) H.G.ELIAS, Makromoleküle, 258, 273 (1975).
- H.KNAUER KG, Berlin, Dampfdruck-Osmometer.

- 21) Z. BOHAK und E. KATCHALSKI, Biochemistry 2, 228 (1963).
- 22) F. LUCAS, J. T. B. SHAW und S. G. SMITH, Adv. Prot. Chem. 13, 107 (1958).
- 23) L. ZERVAS, I. PHOTAKI und N. GHELIS, J. Am. Chem. Soc. 85, 1337 (1963).
- 24) G. L. ELLMAN, Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 (1959).
- 25) Y. DEGANI, A. PATCHORNIK und J. A. MACLAREN, J. Am. Chem. Soc. 88,
3460 (1966).
- 26) J. M. SWAN, Nature 179, 965 (1957).
- 27) M. BERGMAN und F. STUTHER, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 152,
189 (1926).
- 28) B. H. NICOLET, J. Am. Chem. Soc. 53, 3066 (1931).
- 29) D. S. TARBELL und P. P. HARNISCH, Chem. Rev. 49, 1 (1951).
- 30) D. HORTON und D. H. HUTSON, Adv. Carbohydrate Chem. 18, 123 (1963).
- 31) S. KUBOTA, S. SUGAI und J. NOGUCHI, Biopolymers 6, 1311 (1968).
- 32) G. ROSSMEISL, Dissertation, Marburg 1976.
- 33) E. GROSS und H. H. KILTZ, Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 559 (1973).
- 34) A. E. BARKDOLL und W. F. ROSS, J. Am. Chem. Soc. 66, 951 (1944).
- 35) R. STRAESSLE, J. Am. Chem. Soc. 76, 3138 (1954).
- 36) E. J. WILLIAMS und J. F. FOSTER, J. Am. Chem. Soc. 82, 3741 (1960).
- 37) F. PUTNAM in H. NEURATH, The Proteins, Academic Press, New York 1965,
Bd. 3, S. 153.
- 38) P. BRO, S. T. SINGER und J. M. STURTEVANT, J. Am. Chem. Soc. 80,
389 (1958).
- 39) W. SAKAMI und G. TOENNIES, J. Biol. Chem. 144, 203 (1942).
- 40) A. NEUBERGER und F. SANGER, Biochem. J. 37, 515 (1943).
- T. OKUDA und H. ZAHN, Ber. 98, 1164 (1965).
- 41) W. WERNER, Diplomarbeit, Marburg 1972.
- 42) H. U. BERGMAYER, Methoden der enzymatischen Analyse I, S. 550 (1974).
- 43) H. G. ELIAS, Ultrazentrifugen-Methoden, 3. Auflage (1969).

Danksagung

Frau Dr. Ch. Ebert bin ich für zahlreiche Anregungen und Unterstützung - insbesondere in Fragen der Aminosäuren-analyse und der Ultrazentrifugenbestimmungen - zu Dank verpflichtet.

Frau M. Gläser danke ich für die Anfertigung der Röntgen-filme.

Frau I. Hass hat in dankenswerter Weise die Zeichnungen und Photographien angefertigt.

Lebenslauf

Hartmut Knipp

geboren am 6.8.1942 in Hamm/Westf.

1949-1953: Grundschule in Hamm

1953-1964: Freiherr v. Stein-Gymnasium in Hamm

Februar 1964: Abitur

SS 1964: Beginn des Chemie-Studiums an der Wilhelms-
Universität in Münster

Juni 1967: Diplom-Chemiker-Vorprüfung in Münster

März 1971-

Januar 1972: Diplomarbeit am Institut für Biochemie
der Universität Münster

Februar 1972: Diplom-Chemiker-Hauptprüfung in Münster

Oktober 1972: Beginn der Dissertationsarbeit im Bereich Polymere
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

